Vol. 9 • November, 1950 No. 4

JOURNAL OF THE FACULTY OF AGRICULTURE KYUSHU UNIVERSITY

CONTENTS

Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo — A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". III. Infection course of the present disease. 287

Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo — A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". IV. Prevention of the present disease.... 293

Hamada, Matsukichiro und Maekawa, Kazuyuki — Über die Oxydation von Xylan mit Perjodat. 311

Yamafuji, Kazuo und Yuki, Teigen — Ueber den Mechanismus der Virusentstehung in der Zelle. 318

Yamafuji, Kazuo und Goya, Tsutomu — Verhütung der Viruserkrankung durch Eisenverbindungen. 325

Yamafuji, Kazuo und Urakami, Munehiko — Ueber die Einwirkung von Eisen und Hydroperoxyd auf Polysaccharide. 333

Yamafuji, Kazuo und Shibatate, Shigero — Ueber den Ernährungswert von Xylan. 341

Yamafuji, Kazuo and Tono, Tetsuzo — Studies on foodstuffs in emergencies. XXII. On the starch of *Lycoris radiata*. 355

Inaoka, Megumu — Studies on the cytochrome oxidase. IV. Effect of salts on the cytochrome oxidase. 361

PUBLISHED BY THE FACULTY
FUKUOKA
1950



Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshu University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

A RICE NEMATODE DISEASE "SENCHÛ SHINGARE BYÔ"[1]

III. Infection Course of the Present Disease[2]

HAZIME YOSHII AND SHIGEO YAMAMOTO

SOIL INFECTION

It is verified by the preceding experiment (Yoshii, Yamamoto 1950), that the pathogenic nematode of the present disease hibernates mainly within the seed of rice or Italian millet, and sometimes on the straw or seed of some weeds when they are kept in dry state, and that the nematode could scarcely hibernate when these materials were scattered in field. No positive results were obtained from the experiments, carried out from 1944 to 1947, on the infection of the disease through soil. It was found in 1948, however, that 5 culms from ca. 2900 culms of rice were affected by the nematode and showed the white-tip symptom, in newly started rice plots, 5.2×1.8 m. in total size, which were filled with infested soil from the plot in which heavily affected Italian millet had grown in the previous year. It is considered from this fact that the present disease will infect through soil though very rare.

Fukano and Yokoyama (1948) reported that they found the present nematode within the stub of the affected rice-plant after harvest. From the results written above, it is certain that the infection through soil with the affected stub is not important though it may not be negligible.

[1] Contribution from the Laboratory of Plant Pathology, Kyushu University.

[2] I. Symptom and pathogenic nematode. Jour. Facult. Agr., Kyushu Univ., Vol. **9**, No. 3, 1950. II. Hibernation of *Aphelenchoides oryzae*. Ibid. Vol. **9**, No. 3, 1950.

Infection in Seed Bed

a) Infection of the disease when healthy seed was sown in parallel with that diseased.

Four pots, 30 × 30 cm. in size, filled with disinfected soil were used for the seed bed. In each of three of them, healthy (Variety Aikoku)—and diseased (Variety Asahi) seed grains were sown side by side, bordered by a line, 3 cm. in width. The fourth was used for control and Aikoku was sown. After forty days from sowing, the variety Aikoku were picked up and transplanted in eight pots, 50 cm. in diam., as there were 36 seedlings per pot. At the time before the ear, the numbers of plants having the bleached-tip leaves were counted (Table 1). Data in Table 1 indicate the possibility of infection of the disease in seed bed when healthy seed was sown side by side with that affected.

Table 1. Infection of the disease in seed bed when healthy seed was sown in parallel with that affected.

Sort of seed	Plant with bleached-tips	Total plants examined	Per cent of plants with bleached-tips
Healthy + affected	13	36	36.1
ditto	15	37	40.5
ditto	24	35	68.6
ditto	8	35	22.9
ditto	0	34	0.0
ditto	11	33	33.0
Healthy only (Check)	0	35	0.0
ditto	0	40	0.0

b) Infection of the disease through irrigation water in seed bed.

Healthy (Variety Nôrin No. 18)—and diseased (Variety Asahi) seed were sown separately in 2 pots each, 50 cm. in diam. 100 cc. of irrigation water of each of two diseased pots was poured into each of two healthy pots every day since seven days past from sowing. After forty days from the beginning the seedlings of Nôrin No. 18 were picked up and transplanted in 2 plots, 90 × 60 cm. in size, as there were 60 seedlings per plot. For control, healthy seedlings (Nôrin No. 18) were planted separately

The results summarized in Table 2 indicate the possibility of infection through irrigation water in seed bed though scanty in number of the plants that have the bleached-tip symptom.

Table 2. Infection of the disease in seed bed through irrigation water from the bed in which the diseased seed was sown.

Sort of seed bed	Plants with bleached-tips	Total plants examined	Per cent of plants with bleached-tips
Poured with water from diseased bed	3	60	6.7
ditto	4	62	4.9
Not poured into (Check)...	0	100	0.0

c) Infection of the disease in seed bed with husks of the diseased grain.

Healthy seed (Variety Aikoku) was sown in four small pots, 18 cm. in diam., in which disinfected soil was filled. On each of three of the pots, the husks of the grain of the present disease were scattered after the pots were filled with water. On the fourth pot, the check, the boiled husks were scattered. After forty days from sowing, the seedlings from these pots were transplanted in 8 pots, 50 cm. in diam.; thus, in each pot ca. 36 seedlings were planted. The numbers of plants with bleached-tip symptoms were counted at the time before the ear. The data represented in Table 3 show that the present disease will infect

Table 3. Infection of the disease in seed bed when scattered with husks of the diseased grain.

	Plants with bleached-tips	Total plants examined	Per cent of plants with bleached-tips
Scattered with husks of diseased grain...............	5	31	16.1
ditto	3	29	10.3
ditto	16	30	53.3
ditto	8	30	26.7
ditto	14	36	38.9
ditto	20	47	42.6
Scattered with boiled husks (Check)...............	0	35	0.0
ditto	0	36	0.0

in seed bed, when scattered with husks of the diseased grain. even though the disinfected seed was sown.

Infection After the Transplanting

a) Infection of the disease when healthy seedlings were planted with that affected.

Diseased (Variety Asahi)—and health (Variety Aikoku) seed grains were sown separately on two pots each, 18 cm. in diam., which were filled with disinfected soil. After forty days from sowing, they were picked up and transplanted in two plots each, 90×60 cm. in size, forming four rows of ten hills, each consisted of three seedlings, the one healthy and the other two diseased.

Table 4. Infection of the disease when healthy seedling was mixed planted on a hill with that affected.[a]

	Number of hill	—1st row— Healthy seedling	Diseased seedling	—2nd row— Healthy seedling	Diseased seedling	—3rd row— Healthy seedling	Diseased seedling	—4th row— Healthy seedling	Diseased seedling
1st plot	1	+[b]	+	–	–	+	–	–	–
	2	+	+	+	+	–	+	–	–
	3	–	–	–	–	+	+	–	+
	4	–	–	–	–	+	+	–	–
	5	+	–	+	–	–	–	+	+
	6	–	–	–	–	–	–	+	+
	7	–	–	–	–	–	–	+	+
	8	–	–	–	–	+	+	+	+
	9	–	+	–	–	–	–	–	–
	10	–	+	–	+	–	–	–	–
	Total	2	4	2	2	3	4	4	2
2nd plot	1	–	–	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–	–	–
	3	–	–	–	–	–	+	–	–
	4	–	–	–	–	–	–	–	–
	5	–	–	–	–	–	–	–	–
	6	–	–	–	–	+	–	–	–
	7	–	–	–	–	+	–	+	+
	8	–	–	–	–	+	+	–	+
	9	–	–	+	–	–	+	–	–
	10	–	–	–	+	–	+	–	–
	Total	0	0	1	2	3	4	2	2

a) Samples used were the same those of Table 1.

b) + indicates the presence of the bleached-tip symptom.

At the time before the ear, the numbers of plants of each variety having the bleached-tip symptoms were counted. The results thus obtained were given in Table 4, which indicates the distribution of the plants having the bleached-tips. The data in Table 4 show that the infection of the disease occurs when healthy seedling is planted on a hill mixed with that affected.

b) Infection of the disease from the neighbours that affected.

Diseased (Asahi)—and healthy (Nôrin No. 18) seed grains were sown separately on two pots each, 18 cm. in diam., which were filled with disinfected soil. After forty days they were picked up and planted in two plots, 90 × 60 cm. in size, forming alternate parallel rows of healthy and diseased seedlings. The results obtained by counting numbers of plants having bleached-tip symptoms were given in Table 5.

It is obvious from Table 5 that the infection of the disease occurs in rice field from the neighbours.

Table 5. Infection of the disease from the neighbours that affected.[a)]

	Sort of seedlings	Plants with bleached-tips	Total plants tested	Per cent of plants with bleached-tips
1st plot	Diseased	6	12	50.0
	Healthy	2	13	15.4
	Diseased	3	11	27.3
	Healthy	1	13	7.7
	Diseased	2	12	16.7
	Healthy	3	13	23.1
	Diseased	4	13	30.8
	Healthy	2	12	16.7
	Diseased	1	12	8.3
	Healthy	3	13	23.1
2nd plot	Diseased	6	12	50.0
	Healthy	1	11	9.1
	Diseased	3	11	27.3
	Healthy	1	12	8.3
	Diseased	2	12	16.7
	Healthy	2	12	16.7
	Diseased	1	11	9.1
	Healthy	0	12	0.0
	Diseased	0	12	0.0
	Healthy	2	12	16.7

a) Samples used were the same those of Table 2.

SUMMARY

The present disease is a seed-borne disease, and the possibility of soil infection is extremely rare.

Infection occurs in seed bed, by mixed sowing with the diseased seed, through irrigation water from the diseased seed bed, and by using husks of the diseased grain.

Infection occurs also after transplanting.

LITERATURE CITED

Fukano, H., Yokoyama, S., 1948, Proceed. of the Meeting of Agr. Res. Workers in Kyushu, No. 2, 20.

Yoshii, H., Yamamoto, S., 1950, Jour. Facult. Agr., Kyushu Univ., **9**, No. 3, 223.

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

A RICE NEMATODE DISEASE "SENCHÛ SINGARE BYÔ"[1]

IV. Prevention of the Present Disease[2]

HAZIME YOSHII AND SHIGEO YAMAMOTO

The most valid method to prevent the present disease may be the seed disinfection, with the precaution not to bring the pathogen in rice field after the commencement of seed-time. On the other hand, following methods may have some possibilities to control the severity of the disease, though the authors have not yet ample data on these subjects.

1) Improvement of manuring, 2) Modification of seed-time, 3) Application of resistant varieties.

Following experiments to destroy the nematode within seed were carried out for the last four years.

SPRAYING CHEMICAL AT THE EARING STAGE

The majority of the present nematode are situated on the outer side of the flower at the earing stage (Fukano, Yokoyama 1949), and enter the inner side of the glume at the flowering stage. While it was found that the nematode could be killed by a spray of nicotine sulphate (Inoue 1947).

Nicotine sulphate solution with soap, 1:500 in dilution, was sprayed to a half of a diseased plot, 400×30 cm. in size, on September 7th (the beginning of the earing stage), 10th and 17th in 1948. The other half of the plot was left for control.

The mature grains of these two blocks were divided into five parts each. From every part 10 grains were picked out at random,

[1] Contribution from the Laboratory of Plant Pathology, Kyushu University.

[2] I. Symptom and pathogenic nematode. Jour. Facult. Agr., Kyushu Univ., Vol. **9**, No. 3, 1950. II. Hibernation of *Aphelenchoides oryzae*. Ibid, Vol. **9**, No. 3, 1950. III. Infection course of the present disease. Ibid, Vol. **9**, No. 4, 1950.

and the approximate number of living nematodes was counted. Thus fifty counts were carried out for each of ten parts.

A simplified method was applied to obtain the total numbers of the living nematode. 50 measurements of each part were sorted into four classes with the number of nematodes (Table 1). Multiplied the number of each class by the class value, added up, thus the total sum of numbers of the living nematode of each part of two blocks were obtained (Table 2).

Table 1. Classification of the grain samples (each with ten grains) by the number of the nematodes.

Number of nematodes	Class	Class value
Above 20	A	20
6 to 20	B	10
1 to 5	C	3
0	D	0

Table 2. Efficacy of nicotine sulphate spray at the earing stage.

	Total living nematodes in sprayed block	Total living nematodes in not sprayed block
	60	621
	481	684
	155	684
	402	909
	306	701
Total	1404	3599
Mean	280.1	719.8

$D \geqq 334$ Difference between means significant at 5 per cent level.

While, the spray injury due to the chemical was tested and the results were represented in Table 3.

Table 3. Spray injury due to nicotine sulphate applied at the earing stage. Weight of 1000 grains.

	Nicotine sulphate 1:500 sprayed	Not sprayed (Check)
Total weight of 25 counts	(g) 537.07	(g) 555.68
Mean weight	21.483	22.227

$D \geqq 0.686$ Difference between means significant at 5 per cent level.

It is obvious from these data that nicotine sulphate spray at the earing stage will to some extent decrease the number of the present nematode in seed grain, though it is somewhat injurious to rice grain.

Seed Disinfection by Chemicals

a) Disinfection by chloropicrine.

Inspite of their efforts the present authors could not found any concentration of chloropicrine which was not injurious to the vitality of seed, but was available to kill the nematodes in dormant state within hulls of the affected rice grains.

b) Disinfection by formaline.

Formaline solution (containing 35 per cent of formaldehyde) was diluted with water, 1 : 50. Into this were put the following treated rice grains affected by the nematode: 1) soaked in water for 24 hours, 2) soaked in water for 48 hours, and 3) not treated. After being immersed in formaline solution for one, two, and three hours respectively, the grains were drained and washed with water for 2 days. The efficacy of the formaline treatment was examined as usual by searching the living nematode within the treated grains after they were dried.[1]

Data in Table 4 indicate that the nematode within seed grain

Table 4. Existence of the living nematode within seed grain treated with formaline solution, 1 : 50.

Pre-treatment of seed	Immersed in formaline for		
	1 hour	2 hours	3 hours
Soaked in water, 24h.	+	+	+
Soaked in water, 48 h.	+	+	+
Not soaked in water	+	+	+

+ indicates the existence of living nematode.

[1] Ten to twenty unhulled-grains are stripped of their husks. Materials thus obtained are put in a test-tube, into which one cc. of distilled water is poured. Thus about 20 tubes are prepared for one lot. After being kept at 25°C. for 16 to 20 hours, the materials in each tube are poured into a watch-glass. The numbers of both moving (living) and immobile (dead) nematode are counted und a binocular microscope.

could not be killed with the formaline treatment, one of the standard disinfection methods for rice seed.

As for the field trial, the diseased seed treated with formaline solution,[1] was sown in a pot, in parallel with that treated by hot water[2] and with the check.

After 40 days from sowing, the seedlings of these three sources were transplanted in 4 pots respectively, 50 cm. in diam., as there were planted 25 seedlings per pot. At the time of the ear, the number of plants with bleached-tip symptom was counted. The results were given in Table 5.

Table 5. The efficacy of formaline treatment and of the modified hot water treatment for control of the present disease.

	Formaline treatment	Hot water treatment	Check
	0/25	0/25	6/25
	1/25	0/25	2/25
	3/25	0/24	0/25
	7/25	0/25	1/25
Total of converted values of per cents affected	19.55	0	17.67

Numerator represents the number of plants with the symptom, derminator represents the number of total plants examined.

$D \gtrapprox 20.3$ Difference between any two of totals significant at 5 per cent level.

Although no significant differences were found within these cases in Table 5, it is apparent that the formaline treatment is invalid, while it is not hopeless in case of the hot water treatment.

[1] The seed was immersed in formaline of 1:50 in dilution for 3 hours, after being soaked in water for 2 days. At the end of 3 hours immersion in formaline, the seed was soaked again in water for 5 days.

[2] The seed was immersed in hot water at 52°C for 10 minutes, after being soaked in water for 24 hours at 18°C.

Modified Hot Water Treatment of Seed Grain

Nisikado and Nakayama (1942) reported that *Piricularia oryzae* and *Helminthosporium oryzae* on seed could be destroyed when rice seed was treated with a modified hot water treatment: immersed in hot water for 10 minutes at 52°C. after being soaked for 24 hours in water below 20°C. The present authors applied with success the modified hot water treatment to kill the present nematode in seed (Yoshii 1946).

As it was already pointed out (Nisikado, Nakayama 1942), the modified hot water method seems to be almost of the limit permissible to the vitality of rice seed. If the duration of seed soaking in water be prolonged to a certain extent, or if the temperature of hot water be over a certain limit, the germination of seed will at once be inhibited. With two years field trials the authors come to the conclusion that, at least in case of the present nematode disease, it is sufficient to disinfect the seed with hot water at 51°C. for 10 minutes after being soaked in water for 24 hours. The following are the studies carried out from 1944 to 1949 on some factors relating to the modified hot water treatment of seed rice to prevent the present disease.

a) Conditions sufficient to kill the dormant nematode.

The relation between hot water temperature and the vitality of the nematode (preliminary).

Affected grains (Variety Asahi) were divided into ten parts. Eight of them were immersed respectively in different hot water, ranging from 49° to 52°C., with intervals of one degree, for 5 and 10 minutes respectively, after the grains were soaked in water for 22 hours at 20°C. The ninth part was simply soaked in water for 22 hours, and the last one was reserved for control. 20 grains from each of these ten parts were picked out and the existence of the living nematode within them was examined, after the grains were dried up. The results obtained were given in Table 6.

Table 6 indicates that the modified hot water treatment is effective when hot water temperature is ranged above 50°C., provided that the grains were soaked in water for 22 hours at 20°C. previously and immersed in hot water for 5 to 10 minutes.

Table 6. Existence of the living nematode within rice grains treated with hot water methods of varied temperatures

Soaked in water, 22 h.	Treated with hot water	1	2	3	4	5
Soaked	49°C. 5 m.	−	−	−	−	+
ditto	49°C. 10 m.	−	−	−	−	−
ditto	50°C. 5 m.	−	−	−	−	−
ditto	50°C. 10 m.	−	−	−	−	−
ditto	51°C. 5 m.	−	−	−	−	−
ditto	51°C. 10 m.	−	−	−	−	−
ditto	52°C. 5 m.	−	−	−	−	−
ditto	52°C. 10 m.	−	−	−	−	−
ditto	Without hot water	+	+	+	−	+
Not treated (Check)		+	+	+	+	+

+ indicates the existence of living nematode.

Temperature variation of hot water in connection with the efficacy of the modified hot water treatment for the prevention of the present disease (Field trial).

It often occurs in rice plots that the bleached-tip symptoms could not be found on the leaves of the affected plants, especially when they were planted in small pots, though the bleached-tip is the main symptom of the disease. As it was shown in Table 5, the field trials of the present disease were often hindered by this phenomenon to obtain the reliable results, until it was reported by Fukano and Yokoyama (1947) that numbers of the nematodes would be found on the ear of the affected plant even when no bleached-tip symptoms had been observed, and that it was possible to verify the efficacy of a treatment by searching the nematode on the ear of the treated plants. This is an experiment in which the efficacy of the hot water treatment is tested by the method written above.

The diseased grains were immersed in hot water at 49°, 50°, and 51°C. respectively for 5 to 10 minutes, after being soaked in water at 21°C. for 20 hours. For control, not treated grains were used. All of them were sown respectively in small pots, 15 cm. in diam., filled with disinfected soil. After grown up to a certain height, 64 seedlings from each of five sources (cf. Table 7) were transplanted in four pots, 30 × 30 cm. in size, as there were 16 plants per pot. At the flowering stage, the ears of main culms of rice

plants of every pot were collected and each of them was washed separately in a dish with 5 to 10 cc. of water. The presence of the nematode within washed water was examined under a microscope. The results were given in Table 7.

Table 7. Temperature of hot water in modified hot water treatment and its efficacy to prevent the nematode disease.[a]

	49°C. 10 m.	50°C. 5 m.	50°C. 10 m.	51°C. 5 m.	Check
	10/16 [b]	5/16	0/15	0/16	8/16
	2/16	3/16	0/9	0/16	16/16
	14/16	0/16	0/16	0/16	12/16
	0/16	0/16	0/13	0/12	11/14
Total of converted values of per cents affected	142.24	60.58	0	0	257.44

a) Grains were soaked in water before the treatment for 20 hours at 21°C.
b) Numerator indicates the number of plants with nematode, denominator indicates the number of total plants examined.

$D \geqq 108.65$ Difference between any two of totals significant at 5 per cent level.

It is evident from data in Table 7 that both cases, 50°C. 10 minutes and 51°C. 5 minutes are effective, while the case 49°C. 10 minutes is inferior to them.

Necessity of the combined application of two procedures, water soaking of seed and hot water immersion, as a seed treatment to destroy the present nematode.

Modified hot water treatment is a method somewhat complicated to apply in practice. This is an experiment which explains the necessity of the combined use of two procedures, soaking seed in water and immersing seed in hot water, as a method to kill the present nematode within seed, when hot water temperature is placed about 50°C.

Affected rice grains (Variety Asahi) were divided into four

lots. The grains of each lot were treated as follows :—

1) Soaked in water for 20 hours at 5°, 15°, 20°, 25°, and 30°C. respectively .... Immersed in hot water at 51°C. for 7 minutes.

2) .... ditto .... Not immersed in hot water.

3) Not soaked in water .... Immersed in hot water at 51°C. for 7 minutes.

4) .... ditto .... Not immersed in hot water.

The existence of the living nematode was examined as usual at 20 grains. The results were summarized in Table 8.

Table 8. Necessity of the combined application of two procedures, seed soaking in water and hot water immersion (51°C., 7 m.), in hot water treatment.

Seed soaking in water for 20 h.	Hot water immersion 51°C. 7 m.	Temperature of water at seed soaking, °C. 5	15	20	25	30
Soaked	Treated	0	0	0	0	0
ditto	Not treated	5	5	5	3	4
Not soaked	Treated	5	5	5	5	5
ditto	Not treated	5	5	5	5	5

Numerical figure in the table represents the number of cases per five replicates, in which living nematode was found.

Table of analysis of variance :—

		SS	DF	V	F
Presence or absence of of seed soaking	(W)	7.84	1	7.84	313**
Presence or absence of hot water immersion	(H)	4.84	1	4.84	193**
Temperature of water at seed soaking	(C)	0.16	4	0.04	1.60
Interaction	(W×H)	4.84	1	4.84	193**
〃	(W×C)	0.16	4	0.04	1.60
〃	(H×C)	0.16	4	0.04	1.60
〃	(W×H×C)	0.16	4	0.04	1.60
Error		2.00	80	0.025	
Total		20.16	99		

Data in Table 8 indicate that, both factors, soaking seed in water and hot water immersion of seed, are effective to destroy the present nematode, and that the efficacy of the treatment is much increased when these two factors are combined. While no significant differences were observed within the effects of temperatures of water in which rice seed was soaked.

Effect of the duration of seed soaking and temperature of water on the efficacy of the modified hot water treatment.

Affected rice grains (Variety Asahi) were soaked in water for 4, 8, 16, and 20 hours respectively at each of following water temperatures: 5°, 15°, 20°, 25°, and 30°C. After being soaked in water all of them were immersed in hot water at 51°C. for 7 minutes. At the end of 7 minutes immersion they were drained, put into cold water for a while, and then dried.

20 grains were taken from each of these treated, and were examined of the existence of the living nematode after usual manner. The examination ended with five replicates. The results were given in Table 9.

Table 9. Duration of seed soaking and temperature of water in relation to the efficacy of the modified hot water treatment.

Duration of seed soaking (hours)	Temperature of water, °C. 5	15	20	25	30	Total
4	2	3	1	2	2	10
8	0	1	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0

Numerical figure in the table represents the number of cases per five replicates, in which living nematode was found.

$D \geqq 5.28$ Difference between any two of totals significant at 1 per cent level.

Data in Table 9 indicate that the efficacy of the hot water treatment is dependent on the duration of seed soaking, and that only the case, soaking in water for 4 hours, is insufficient. As to the effect of temperature of cold water, no significant result was again obtained from this experiment.

Summarizing the experimental results, it is noted that the modified hot water treatment is effective to kill the nematode within rice grain, when applied with the following standards :—

1) Soaking seed in water for 8 to 20 hours, followed by,
2) Immersing seed in hot water at 51°C (with a range from 50° to 52°C.) for 7 minutes (with a range from 5 to 10 minutes).

b) Modified hot water treatment and the germinating power of seed grain.

Following experiments were carried out to find some bases on the modified hot water treatment practically not injurious to the vitality of rice grain but effective to kill the nematode. For all of the experiments unhulled-grains, Variety Asahi, were used which were well dried, and the water content was less than 12 per cent. Before use, they were immersed in water and the scums were driven away.

Loss of vitality of seed grain when treated with modified hot water treatments of varied factors.

36 varieties of modified hot water treatment will be obtained by the combinations of the following three factors: duration of seed soaking in water, temperature of water for seed soaking, and hot water temperature, when each of them varies as follows :—

Duration of seed soaking in water :	24, 48, 72 hours.
Temperature of water for seed soaking :	5–7°, 15°, 20°, 25°C.
Temperature of hot water :	51°, 52°, 53°C.

For the present study 144 cases were planned derived from above 36 combinations with four replicates. The duration of hot water immersion was fixed to 10 minutes.

20 grains treated with each of these 144 cases were put into a germinator with wet sand. After 5 days at 25°C. the germinative capacity was examined. The results were given in Table 10.

Data in Table 10 indicate that,

1. Within the durations of seed soaking in water, 24, 48, and 72 hours, the first is preferable; when it is prolonged, increase of ill-effect on the vitality of grain will result.

Table 10. Loss of vitality of seed grain treated with modified hot water methods of varied combinations of duration of seed soaking, water temperature for seed soaking, and hot water temperature.

	T_1				T_2				T_3			
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4
H_1	0	0	1	1	0	0	0	5	1	0	11	10
	0	1	2	0	2	1	1	10	1	1	13	10
	1	0	1	0	0	0	1	12	1	1	11	11
	0	1	0	2	0	1	2	11	2	0	16	10
H_2	1	1	0	0	2	0	3	17	0	2	15	13
	0	1	4	1	1	2	1	17	1	2	12	14
	0	3	1	0	1	4	2	16	0	0	17	16
	0	0	2	0	2	1	1	14	2	2	18	18
H_3	2	2	3	5	2	4	9	18	9	8	18	19
	4	2	7	4	5	3	4	19	11	8	18	20
	4	1	3	4	6	4	4	19	11	7	16	20
	0	3	7	5	3	3	10	18	10	8	17	20

T_1 T_2 T_3, each indicates the duration of seed soaking: 24, 48, 72 hours.
C_1 C_2 C_3 C_4, each indicates the temperature of water for seed soaking: 5~7, 15, 20, 25 (°C.).
H_1 H_2 H_3, each indicates the temperature of hot water: 51, 52, 53 (°C.).
Figure in the table represents the number not germinated per 20 grains.

Table of analysis of variance:—

		SS	DF	V	F
Duration of seed soaking	(T)	1434.0	2	717.0	358.50**
Water temperature for seed soaking	(C)	1749.4	3	583.1	291.55**
Hot water temperature	(H)	697.6	2	348.8	174.40**
Interaction	$(T\times C)$	1222.8	6	203.8	101.90**
〃	$(T\times H)$	99.3	4	24.8	12.40**
〃	$(C\times H)$	61.7	6	10.3	5.15**
〃	$(T\times C\times H)$	107.7	12	9.8	4.90**
Error		215.5	108	2.0	
Total		5588.0	143		

Total sum of numbers not germinated grain for each series (T, C, H), and the differences between any two of totals of each series significant at 5 per cent level are given below (D_T, D_C, D_H).

T_1 T_2 T_3: 80 261 451; $D_T \geqq 27.7$
C_1 C_2 C_3 C_4: 85 77 251 379; $D_C \geqq 24$
H_1 H_2 H_3: 155 230 407; $D_H \geqq 27.7$

2. Within the temperatures of water for seed soaking, 5—7°, 15°, 20°, and 25°C., the former two are excellent, while ill-effect on the vitality of grain will be observed, when it becomes higher than 20°C.

3. Within the hot water temperatures, 51°, 52°, and 53°C., 51°C. is preferable; when it becomes higher the worse effect on the vitality of grain will be the result.

4. The interaction within any two or three of these three factors is multiplicative, and the loss of vitality of every seed will be the result when worse factors are combined.

Effect of variation of the duration of hot water immersion and of the hot water temperature on the germinating power of rice grain, in the modified hot water treatment.

Rice grains soaked in water for 20 hours at a temperature ranging from 18° to 20°C., were treated with hot water at each of three sorts of temperatures, 51°, 52°, and 53°C., for 5, 10, and 15 minutes respectively. After being treated the grains were placed on the germinators with wet sand at 25°C. For control, grains not treated with hot water were used. The germinative capacity was tested after four days. The results obtained with four replicates were given in Table 11.

Table 11. Effect of hot water temperature and of duration of hot water immersion on the germinating power of seed grain.

	Control (minutes)			51°C. (minutes)			52°C. (minutes)			53°C. (minutes)		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15
	0	1	1	0	3	0	0	1	1	1	1	7
	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	2
	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	3	6
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	9
Total	1	1	1	0	4	2	0	2	3	2	5	24

Numerical figure in the table represents the number not germinated per 20 grains.

6, 5, 31 .... Totals for 51°, 52°, 53°C.

2, 11, 29 .... Totals for 5, 10, 15 minutes (Without Control).

$D \geq 12.3$ Difference between any two of totals of each series significant at 5 per cent level.

Table of analysis of variance for 51, 52, 53°C. :—

	SS	DF	V	F
Duration of immersion	31.5	2	15.8	10.53**
Temperature of hot water	36.2	2	18.1	12.67**
Interaction	42.8	4	10.7	7.13**
Error	40.5	27	1.5	
Total	151.0	35		

Data in Table 11 indicate that in case of the modified hot water treatment, both factors, the duration of hot water immersion and the temperature of hot water have a decided effect on the vitality of seed grain. Within the durations of immersion in hot water examined, 5 and 10 minutes are preferable while 15 minutes is inferior. Within the temperatures of hot water examined, only 53°C. is the worse. The effect of these two factors, the duration of immersion and the temperature of hot water, on the vitality of seed grains are multiplicative.

In case of practical apply of the modified hot water treatment of rice seed to prevent the nematode disease, it is preferable to place the upper limit of hot water temperature at 52°C., and the limit of duration of immersion in hot water at 10 minutes.

Retardation of germination of seed treated with the modified hot water treatment.

As indicated in the last experiment, the germinating power of seed grain will not be injured when it is treated with the modified hot water treatment : soaked in water at 18° to 20°C. for 20 hours then immersed in hot water at 51° to 52°C. for 10 minutes. By experience, however, it seems probable that the seedling from the treated grain is somewhat retarded in its growth. This is an experiment to see whether the retardation of growth of the treated grain is true or not.

20 grains soaked in water for 22 hours at 20°C., were treated at 52°C. for 10 minutes. After the treatment they were placed on a germinator with wet sand. After four days at 25°C., each of them was measured of the length of radicule and coleoptile. Two groups of 20 grains each, soaked only in water for 22 hours, were used for control. One of them was measured after three days at

25°C., while the other after four days at 25°C. The results were summarized in Table 12.

Table 12. Retardation of germination of seed treated with the modified hot water treatment (Mean values of 20 measurements).

Treatment	Modified hot water treatment a)	Water-soaked (Check 1) b)	Water-soaked (Check 2) b)
Duration in germinator	4 days at 25°C.	3 days at 25°C.	4 days at 25°C
	(mm)	(mm)	(mm)
Radicule length	23.25	22.60	34.25
Coleoptile length	7.60	5.35	10.80

a) Grains soaked in water at 20°C. for 22 hours, immersed in hot water at 52°C. for 10 minutes.

b) Grains soaked in water at 20°C. for 22 hours.

$D \geqq 1.95$ Difference between any two of radicule lengths significant at 5 per cent level.

$D \geqq 2.37$ Difference between any two of coleoptile lengths significant at 5 per cent level.

Data in Table 12 indicate that the grain treated with the modified hot water treatment: soaked in water at 20°C. for 22 hours, then treated with hot water at 52°C. for 10 minutes, is retarded by one day growth.

Best season for the modified hot water treatment.

All of the preceding experiments were given to the treatment applied just before the seed-time. Following trials were undertaken to see the efficacy to kill the nematode and the ill-effect of the treatment to the grain when applied long before the seed-time.

(i) Vitality of the nematode and the germinating power of seed grain, when treated long before the seed-time with the hot water method; the case in which hot water temperature was kept at 51°C. for 7 minutes.

Both healthy and affected grains were treated with the hot water method at every month from January to April. The temperatures of water in which the grains were soaked for 18 to 24 hours, varied under room temperature. The grains were equally immersed in hot water at 51°C. for 7 minutes. After being treated,

they were dried for several days and preserved until the seed-time (June 23rd). The checks were treated at June 22nd.

On June 23rd, the healthy grains of all five lots were placed on the germinators with wet sand, at 25°C. for three days. While the diseased grains were arranged to find the living nematode as usual. The results obtained were given in Table 13.

Table 13. Vitality of the nematode and the germinating power of seed grains treated with the hot water treatment at varied seasons before the seed time.

Date of treatment	Seed soaking in water		Hot water immersion		Existence of living nema.	Germinability[a)]	
						Not germinated grains	Total grains
	(°C.)	(hours)	(°C.)	(hours)			
Jan. 26	6~10	24	51	7	—[b)]	8	266
Feb. 19	12	24	51	7	—	9	276
March 23	10~12	18	51	7	—	5	371
April 29	12~16	18	51	7	—	6	304
June 23	20~21	18	51	7	—	6	245

a) Examined after 3 days at 25°C.

b) 100 grains were examined.

$F_0 = 0.750$ Homogeneity test within per cents of grains not germinated. F_0 is smaller than F value ($n_1=4$, $n_2=\infty$) at 5 per cent level.

Data in Table 13 indicate that when the temperature of hot water was kept at 51°C. and the duration of hot water immersion at 7 minutes, no significant differences are found within the germinabilities of grains treated at varied seasons, and that the nematode is dead in every treatments.

(ii) Germinating power of seed grains and the growth of seedlings at the fourth-leaf-stage, when seed grains were treated long before the seed-time with the hot water method; the case in which the hot water temperature was kept at 52°C. for 10 minutes.

Seed grains, treated with the hot water method (soaked in water for 18 to 20 hours then treated with hot water at 52°C. for 10 minutes) on Feb. 3rd, April 2nd, and May 23rd respectively, were placed on each of three germinators with wet sand, on May 24th at 25°C. After being kept for six days the germinating

power was examined, counting the number not germinated per 20 grains. The trials were ended with eight replicates. The results were given in Table 14.

Table 14. Inhibition of germinability of seed grains treated with the modified hot water treatment at varied seasons before the seed-time; the case in which hot water temperature was kept at 52°C. for 10 minutes. [a]

Date of treatment	Feb. 3rd	April 2nd	May 23rd
Seed soaking	15°C. 18 h.	12°C. 18 h.	20°C. 20 h.
Hot water immersion	52°C. 10 m.	52°C. 10 m.	52°C. 10 m.
	1 [b]	0	1
	2	1	1
	0	0	0
	1	0	0
	2	2	0
	0	0	0
	0	0	0
	2	0	0
Total	8	3	2

a) Examined after 6 days at 25°C.

b) Numerical figure in the table represents the number not germinated per 20 grains.

$D = 6.14$ Difference between any two of totals significant at 5 per cent level.

From data in Table 14, no significant differences could be found between any two of these three treatments. While a decided difference of growth of the seedlings from the grains treated on Feb. 3rd is observed, when compared with others at the fourth-leaf-stage (Table 15).

It is evident from these experiments that when the hot water temperature is lower and the duration of immersion is shorter (e.g. 51°C. 7 minutes), the ill-effect of the seed treatment to the germination will not occur even though treated five months before the seed-time. While the retardation of growth of seedlings will be observed when treated with the factors somewhat higher (e.g. 52°C. 10 minutes), at the season three months before the seed-time. It may also be probable, though not experimented, that the ill-effect on the growth of rice will result, when the factors, that

sometimes cause ill-effect on the germinating power of rice grains, such as, the temperature of water for seed soaking and the duration of soaking, are combined with the prolonged period, from the treatment to the seed-time.

Table 15. Growth of seedling from the grains treated with the modified hot water treatment at varied seasons before the seed-time; the case in which hot water temperature was kept at 52°C. for 10 minutes. [a]

Date of treatment	Feb. 3rd	April 2nd	May 23rd
Seed soaking	15°C. 18 h.	12°C. 18 h.	20°C. 20 h.
Hot water immersion	52°C. 10 m.	52°C. 10 m.	52°C. 10 m.
	(cm)	(cm)	(cm)
Total height of 50 plants	586.6	665.6	684.6
Mean	11.73	13.31	13.69

a) Measured at the fourth-leaf-stage.

$D \geqq 0.786$ Difference between any two of means significant at 5 per cent level.

To apply the modified hot water treatment in practice for the disinfection at the season before the seed-time, it may be preferable to settle the day of disinfection not exceeding 60 days before the sowing time, even when the seed be treated at 51°C. for 7 minutes.

Summary

Experiments on the seed disinfection method have been carried out.

A modified hot water treatment of seed, "Soaking in cold water below 20°C. for 16 to 20 hours, then, immersing in hot water at 51°C. (with a range from 50° to 52°C.) for 7 minutes (with a range from 5 to 10 minutes)" is found to be a safe and effective method to prevent the present disease.

Considerations on the season in which it is best to apply the modified hot water treatment are given.

Literature Cited

Fukano, H., Yokoyama, S., 1947, 14th annual meeting of Plant Protection Soc., Kyushu, at Beppu, Nov. 1947 (Speech).

Inoue, Y., 1947, ditto, (Speech).

Nisikado. Y., Nakayama, T., 1942, Jour. Plant Protection, **29**, 76, 120.

Yoshii, H., 1946, Annual rept. on rice diseases, sent to the Ministry of Agriculture for the year 1945 Mimeograph printing).

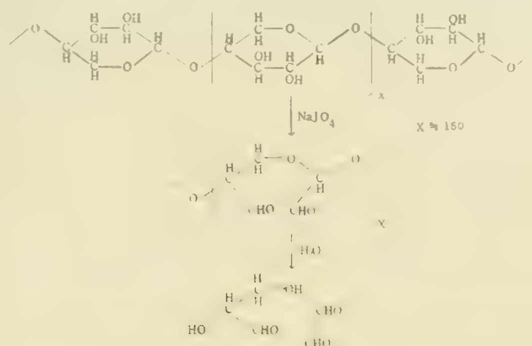
Journal of the Faculty of Agriculture, Kyûshû University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

ÜBER DIE OXYDATION VON XYLAN MIT PERJODAT*†

Matsukichiro Hamada und Kazuyuki Maekawa

Über die Verwertung von Xylose und seinem Polymere durch Tiere bzw. Mikroben sind schon einige Ergebnisse berichtet worden[1,2,3]. Die Konfiguration von Xylan war durch Haworth und seine Mitarbeiter[4,5,6,7] wie folgend festgestellt worden, dass Xylopyranoseeinheiten sich an ihrer 1, 4 Stelle und in β-Typus verbinden. Den Polymerisationsgrad der Xyloseanhydridreste im Xylan hat Husemann[8] als beinahe 150 berichtet.

Wenn Xylan die Perjodat-Oxydation, sog. Glykol-Spaltung erleiden kann, so wird bis auf weiteres vermutet, dass diese



Spaltung zwischen der einzigen benachbarten Hydroxyl-Gruppe habenden Kohlenstoffatomen der Xyloseanhydridreste, C2–C3,

* Vorgetragen vor dem Bezirksverein West-Japan von der Agr. Chem. Soc. Japan am 7 Juni 1947. Refr., J. Jap. Soc. Food & Nutrition, 1 (1947), 28.

† Nachherige Anmerkung; Die Arbeiten von G. Jayme und M. Särtre "Über die Oxydation des Xylans mit Perjodsäure" Ber., 75 (1942), 1840, ibid 77 (1944), 242, 248" sind uns erst nach Fertigstellung dieser Mitteilung (13 Sept. 1947) bekannt geworden.

stattfinden kann, und dass Glycerinaldehyd und Glyoxal bei der Hydrolyse des mit Perjodate aus Xylan erhaltenen Oxyxylans entstehen kann.

Wenn man nach diesem Verfahren aus Xylan Glycerinaldehyd gewinnen kann, obgleich je zwei Kohlenstoffatome aus C_5-Einheit von den Xyloseanhydridresten verloren gehen, so ist dies sowohl eine neue Erkenntnis, als auch ein gewisser Beitrag zur Lösung des Ernährungsproblems.

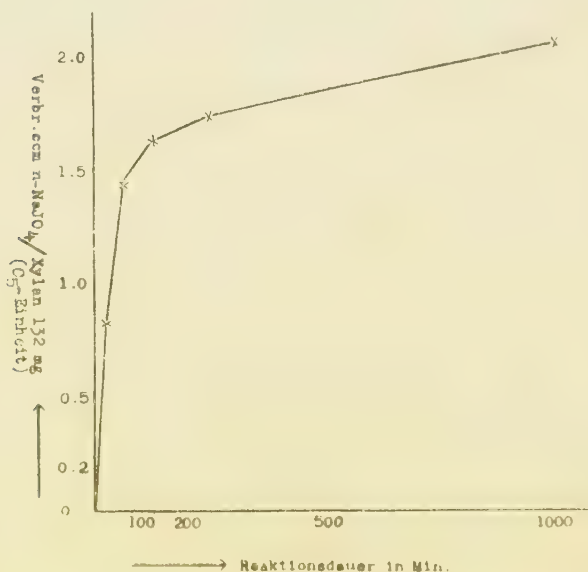
Wir beschäftigten uns also mit Perjodat-Oxydation von Xylan und, wie erwartet, konnten wir aus dem Hydrolysate des Oxyxylans Glycerinaldehyd mit guter Ausbeute isolieren.

Beschreibung der Versuche

I. Spaltung des Xylans mit Natrium-meta-Perjodat.

Xylan, das aus Weizen- und Reisstroh nach gewöhnlicher Weise[5,6] gewonnen worden war, war in seinem Pentosangehalte 92,6%. 6.6 g (1/20 von C_5-Einheitsgewicht) dieser Probe wurde in

Fig. 1



500 ccm Glasstöpselflaschen abgewogen, hierzu wurden 300 ccm 0.383 n-Natriumperjodat (1.15 Äquivalenz für C_5-Einheit von Xylan) zugesetzt, dieses wurde bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Erschüttern belassen, bis sich die erforderliche Reaktion vollzog. Die Oxydation ging während der ersten zwei Stunden verhältnismässig schnell vor sich, es bedurfte aber 15 Stunden, um 2-Äguivalenz von Perjodate zu verbrauchen (Fig. 1).

Es wurde dann durch Kollodiummembran dialysiert, um anorganische Substanzen zu entfernen, und in Vakuum bis 50 ccm eingedampft. Zwei Volumen Aceton zur letzteren hinzugegossen, bewirkten weissen Niederschlag, der aus Oxyxylan bestand. Ausbeute 4.6 g.

II. Eigenschaften des oxydierten Xylans.

Diese oxydierte Substanz war dem anfänglichem Xylan anscheinend gleich, aber in gewisser Weise spröde, überdies ergab dies nach Tollens'schem Verfahren für Pentosan-Bestimmung fast kein Furfural, vielmehr reduzierte Fehling'sche Lösung und ziemlich viel Jod, kondensierte mit Phenol und Anilin und zeigte grössere Alkalizahl[9]. Diese Tatsache wurde in Tafel 1 zusammengefasst.

Tafel 1.

	Xylan	Oxyxylan
Pentosangehalt als Phloroglucid (Tollens'sches Verf.)	92.6%	spur
Reagiertes Phenol (Pro 132 mg)	64.4 mg	361.8 mg
Reagiertes Anilin (Pro 132 mg)	67.6 mg	184.4 mg
Jodverbr. nach Willstätter und Schudel'schem Verf. (ccm 0.1 n Jod/132 mg)	spur	30.01
Alkalizahl nach Schoch u. Jensen	28	54

Aus der Differenz der Daten für Kontrollansatz und Hauptversuch ist leicht zu erkennen, dass die Oxy-Probe eigentümlicherweise reich an Aldehyd ist.

III. Hydrolyse von oxydiertem Xylan.

4 g oben erwähntes Oxyxylan wurde in gut schliessenden Glasstöpselflaschen in 150 ccm Wasser suspendiert und mit 50 ccm 1.5 n-Schwefelsäure versetzt. Die Hydrolyse wurde in kochendem Wasserbad nach 30-stündigem Aufbewahren vollzogen. Das dabei entstandene wenige Harz und Unlösliches wurden entfernt und betrugen etwa 0.2 g.

(i) Glyoxal aus dem Hydrolysate

(a). 10 ccm obiges Hydrolysat wurde mit einer Lösung von 0.4 g 2, 4-Dinitrophenylhydrazin in 10 ccm Eisessig versetzt. Nach einstündigem Erhitzen in der geschlossenen Röhre im Wasserbad wurde der entstandene gelb-orange Niederschlag abgesaugt, erst mit schwacher Essigsäure, dann mit Wasser gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug 0.408 g= 63.4% der Theorie. Nach Umkristallisieren aus Essigsäureanhydrid zeigte die Substanz den unveränderlichen Schmelzpunkt 322° unter Zersetzen[10, 11].

2.311 mg Subst.: 0.531 ccm N_2 (22.3°, 767.3 mm)

$C_{14}H_{10}O_8N_8$	Ber. N	26.84%
	Gef. N	26.79%

(b). Von einem anderen der obigen Hydrolysate entfernte man die Schwefelsäure mit Bariumcarbonat, 20 ccm dieses neutralen Hydrolysates wurden mit einer Lösung von 0.7 g Phenylhydrazin in 10 ccm Äthanol vermischt. Es entstand sofort ein gelber Niederschlag, der bei Erhitzen bald orange wurde, das Gemisch wurde nunmehr eine Stunde lang erhitzt. Die Kristalle wurden abgesaugt und mit Wasser gewaschen, sowie im Vakuum getrocknet. Erhalten wurden 0.4492 g. Osazon=43.2% der Theorie, nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol zeigte die Substanz den Schmp. 169°[12, 13, 14, 15]. Die Verbindung bildet gelbe warzenförmige Aggregate.

2.880 mg Subst.: 0.563 ccm N_2 (21.5°, 768 mm)

$C_{14}H_{14}N_4$	Ber. N	23.53%
	Gef. N	22.91%

Beide wurden durch Mischprobe als Glyoxalderivate festgestellt.

(ii) Glycerinaldehyd aus dem Hydrolysate

Das rückbleibende neutrale Hydrolysat wurde nach Entfärbung mittels Tierkohle zuerst im Vakuum bei 35°, dann über Schwefelsäure im Exsikkator verdampft. Der völlig farblose Sirup erstarrte nach 4 Wochen zu einem Brei weisser Kristalle. Nach Umkristallisieren aus 50%igem Methanol zeigte es den Schmp. 136°[16]. Ausbeute 2 g. Dies bildet farblose Nadeln, die wie die Kohlenhydrate im allgemeinen in organischen Solventien schwer, in Wasser ziemlich löslich sind. Diese Substanz zeigte Phloroglucin-Reaktion von Glycerinaldehyde nach Wohl und Neuberg[16] bzw. Resorcin, Thymol, β-Naphtol Reaktion nach Deniges[17] jede für sich stark.

(a) Benzoylierung des Glycerinaldehyds; 0.5 g fein gepulverter Glycerinaldehyd (oben erwähnte) wurden in 30 ccm Pyridin suspendiert und mit 3.5 g Benzoylchlorid versetzt, wobei erhebliche Erwärmung eintrat. Am nächsten Tage wurde die Hauptmenge des Pyridins im Vakuum abdestilliert, der dünne Sirup mit Eiswasser durchgeknetet und einige Stunden unter wiederholter Erneuerung des Wassers der Kristallisation überlassen. Ausbeute 1.8 g. Das Benzoat ist etwas leichter löslich in Äthanol, nach 4-maligem Umkristallisieren aus Äthanol zeigte es den Schmp. 80°[18].

(b) 2,4-Dinitro-phenylhydrazon des O-Benzoyl-Glycerinaldehyds; 0.3 g benzoylierten Glycerinaldehyd wurden mit 0.5 g 2,4-Dinitro-phenylhydrazin in 30 ccm Äthanol und 3 ccm Eisessig vermischt. Nach einiger Zeit begann die Kristallisation des gelben Hydrazons, während die roten Nadeln des Hydrazins allmählich verschwanden. Zur Vervollständigung der Umsetzung wurde es nach etwa 30 Min. kurz aufgekocht. Rohprodukt 0.4 g. Nach Reinigung aus Eisessig zeigte es den Schmp. 177° (unkorr.).

3.256 mg Subst.: 0.255 ccm N_2 (22.3°, 767.3 mm)
$C_{23}H_{18}O_8N_4$ Ber. N 9.18%
Gef. N 9.13%

Betreffs Oxyxylans und seines Hydrolysierens geht es um folgende Ziffern.

Tafel 2.

Xylan	Oxyxylan	Glycerinaldehyd	Glyoxal als	
			2, 4-Dinitro-phenylosazon	Phenylosazon
6.6 g 92.6%	4.6 g	2.0 g	63%	43%

Dieser Versuch wurde mit Hilfe der Ausgaben des Unterrichtsministeriums für Wissenschaftliche Forschung durchgeführt, wofür die Verfasser an dieser Stelle Dank sagen möchten.

LITERATUR

(1) M. M. Miller u. H. B. Lewis; J. biolog. Chem., **98** (1932), 133; 141.
(2) H. Iwata; Bull. Imp. Coll. Agric. Forest., (Morioka), **21** (1935), 1.
(3) W. Voss u. G. Butter; Ann., **534** (1938), 161.
(4) W. Voss, R. Bauer u. J. Pfirschke; Ann., **534** (1338), 135.
(5) H. A. Hampton, W. N. Haworth u. E. L. Hirst; Soc., **1929**, 1739.
(6) R. A. S. Bywater, W. N. Haworth u. S. Peat; Soc., **1937**, 1983.
(7) W. N. Haworth u. E. G. Percival; Soc., **1931**, 2850.
(8) E. Husemann; Naturw., **27** (1939), 595; J. prakt. Chem., **155** (1940), 13.
(9) T. J. Schoch u. C. C. Jensen; Ind. Eng. Chem. Anal, Ed., **12** (1940), 531.
(10) S. Gladstone u. A. Hickling; Soc., **1936**, 824.
(11) H. J. Lucas, A. N. Prater u. R. E. Morris; Am., **57** (1935), 725.
(12) C. S. Hudson u. Mitarb; Am., **59** (1937), 2049.
(13) C. S. Hudson u. Mitarb; ibid., **60** (1938), 989.
(14) K. Hess u. Cl. Uibrig; Ber., **50** (1917), 367.
(15) E. Fischer; Ber., **17** (1884), 575.
(16) A. Wohl u. C. Neuberg; Ber., **33** (1900), 3095.
(17) G. Denigès; Bull., (4) **5** (1909), 878; C. A. **3** (1909), 1163.
(18) P. Brigl u. H. Grüner; Ber., **66** (1933), 931.

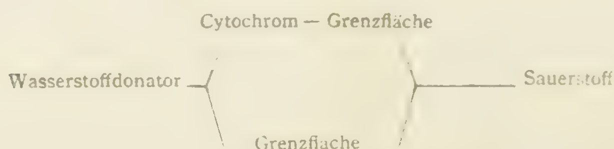
Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol 9, No. 4
November 30, 1950

UEBER DEN MECHANISMUS DER VIRUSENTSTEHUNG IN DER ZELLE

KAZUO YAMAFUJI UND TEIGEN YUKI

Für die Untersuchungen der chemischen Vorgänge in der lebenden Zelle haben wir seit über zehn Jahren häufig die Seidenraupe als Material verwendet. Dieses Insekt ist für die diesbezüglichen Erforschungen besonders geeignet, denn in seinem Körper erfolgen wegen des starken Wachstums im Larvenstadium und der Metamorphose in den darauffolgenden Entwickelungsperioden sehr kräftige Stoffwechselprozesse. Ferner können wir unter der Verwendung des genannten Versuchstieres einheitliche Daten erhalten, da wir eine grosse Anzahl der Raupen gleichzeitig zu züchten und also die individuellen Fehler zu vermeiden vermögen. Im Verlaufe der so wiederholten Züchtungen des Seidenspinners wurde bisweilen beobachtet, dass bei diesem Insekt eine Viruskrankheit ohne direkte Ansteckung entsteht. Nach langen eingehenderen Beobachtungen derartiger Erscheinung kamen wir zu der Annahme, dass für die Viruserkrankung nicht immer eine Infektion des Virus notwendig ist, dass nämlich eine Virusbildung auch durch irgendwelche abnorme Stoffwechselvorgänge herbeigeführt werden kann. Die Tatsachen, dass alle bisher rein hergestellten pflanzlichen sowie tierischen Viren als hochmolekulare Nucleoproteine charakterisiert worden sind, dass für die Vermehrung der Viren auf jeden Fall das Mitvorhandensein der lebenden Zellen unerlässlich ist und ferner, dass eine plötzliche weitreichende Entstehung der Viruskrankheiten oft in der Natur beobachtet wird, scheinen die oben erwähnte Annahme zu stützen. Wenn dies der Fall ist, so müssen solche Stoffwechselverschiebungen, die zur Bildung der Virusmoleküle führen, Prozesse sein, die im allgemeinen in der Gewebezelle verhältnismässig leicht geschehen können. Auf Grund der oben beschriebenen Tatsachen vermuteten

wir weiter, dass bei der Neubildung des Virus vor allem eine Störung des Eiweissstoffwechsels und des Atmungsvorganges zu bewirken sind. Andererseits haben wir in einer ganzen Reihe von Arbeiten festgestellt, dass bei der Sauerstoffatmung in den meisten Fällen Wasserstoffperoxyd als Endprodukt gebildet wird. Nach unserer Theorie wird nämlich der terminale Prozess der Atmung folgendermassen formulert (1).



Es ist demnach anzunehmen, dass das Wasserstoffperoxyd, welches durch Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der Katalasewirksamkeit im Gewebe überschüssig entstand, auf das normale Protoplasmaeiweiss denaturierend und ferner polymerisierend wirkt. Das so polymerisierte Nucleoprotein könnte unter den günstigsten Bedingungen die Virusnatur bekommen. Unter dieser Voraussetzung haben wir mit verschiedenen Materialien von pflanzlicher bzw. tierischer Herkunft die Wirkung der Viren auf die Atmung oder Katalase in den Zellen (2, 3), die Beziehung zwischen der katalatischen Aktivitat und der Sauerstoffabsorption bei viruskranken Organismen (4), die Bildung des Riesenmoleküls des Eiweisses oder des Virusproteins in den lebendigen Geweben durch künstliche Mittel (5 bis 9) und die vorbeugende Fähigkeit der Katalase gegen Viruskrankheit (10) untersucht. Unsere Hypothese der spontanen Erzeugung der Virosen wurde aber durch die Versuche am Seidenspinner am deutlichst bestätigt. Wie oben erwähnt, muss bei der Entstehung des Virus in erster Linie eine Denaturierung des Nucleoproteins im Protoplasma stattfinden, ohne dass dabei das Leben der betreffenden Zelle geschädigt wird. Tatsächlich sind wir imstande, bei der Seidenraupe durch milde Erwärmung des Larvenkörpers oder durch Fütterung mit verdünnter Formaldehydlösung eine Viruserkrankung hervorzurufen. Bei der Erforschung des chemischen Mechanismus dieser Erscheinungen wurde festgestellt, dass durch solche Mittel, wie erwartet, eine Anhäufung des Wasserstoffperoxydes bewirkt wird (5). Die Ansicht, dass in

den Bildungsvorgängen der Virusmoleküle das im Gewebe unzerstört gebliebene Hydroperoxyd eine wesentliche Rolle spielt, würde dann am klarsten erwiesen, wenn es uns gelungen wäre, durch Behandlung der Lebewesen mit einer Hydroperoxydlösung unmittelbar eine Virusentstehdng hervorzubringen. Es ist jedoch schwer, wegen der leichten Zersetzbarkeit des Wasserstoffperoxyds, das angewandte Peroxyd auf den Eiweisskörper in der Zelle genügend stark einwirken zu lassen. In der Tat konnten wir bei der Einwirkung der Hydroperoxydlösung auf lebendige Organismen keine Neubildung des Virusproteins, wohl aber eine Bildung des höhermolekularen Eiweissstoffes nachweisen (6). Wir haben daher versucht, eine momentane Anhaufung von Wasserstoffperoxyd in der Gewebezelle dadurch zu bewirken, dass wir ein spezifisches Mittel anwandten, das auf die Katalase eine hemmende Wirkung, jedoch auf die Atmung fast keinen Einfluss ausübt. Dieser Versuch wurde unter Anwendung von Hydroxylamin mit Erfolg ausgeführt, das heisst, durch Versorgung mit einer Hydroxylaminhydrochloridlösung vermochten wir bei der Seidenlarve eine Viruskrankheit entstehen zu lassen (7). Aus den Ergebnissen der weiteren ausführlicheren Untersuchungen der experimentellen Produktion des Virusproteins wurde der Schluss gezogen, dass die Virusbildung in der lebendigen Zelle nach folgendem Schema verläuft (8).

Normales Nucleoprotein——Denaturiertes Nucleoprotein——
——Polymerisiertes Nucleoprotein·········Virusmolekül.

Das im Vergleich mit der Katalaseaktivität überflüssig entstandene Wasserstoffperoxyd wirkt also bei diesen Vorgängen hauptsächlich als Denaturierungs- sowie Polymerisationskatalysator. Wirklich wird die Katalase in der Zelle durch Einwirkung der Viren gehemmt (2, 3). Dementsprechend ist also möglich, dass die Viruskrankheit durch Einnehmen von Katalase einigermassen verhütet werden kann. Auch diese Möglichkeit wurde durch die Versuche an der Seidenraupe bestätigt (9).

Obwohl unsere Theorie über den Chemismus der Bildung bzw. der Vermehrung des Virusmoleküls in der eben berichteten Weise als sicher aufgestellt werden kann, erscheint es uns doch zweckmässiger, weiterhin nachzuweisen, dass direkt unter der Einwirkung der Peroxydverbindungen auf den lebendigen Eiweisskörper

eine Viruserkrankung herbeigeführt wird. Da bei den oben angegebenen Versuchen mit der Hydroperoxydlösung keine befriedigenden Resultate gewonnen wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine solche Substanz gewählt, die im Gewebe allmählich zerlegt wird und dabei das Wasserstoffperoxyd abgibt. Wir haben nunmehr nämlich den Seidenwürmern eine geringe Menge Bariumperoxyd mit den Maulbeerblattern zusammen gegeben. Nach bestimmten Tagen zeigte sich erwarteterweise eine Anzahl viruserkrankter Individuen. Zugleich wurde hierbei gefunden, dass durch die Fütterung mit dem Bariumperoxyd nicht nur eine Erniedrigung der Katalasewirksamkeit, sondern auch eine Erhöhung der Atmungsintensität im Körper hervorgebracht wird. Infolgedessen geschieht in dem mit dem genannten Peroxyd gefütterten Larvenkörper eine überschüssige Hydroperoxydbildung sowohl bei der Peroxydzerlegung als auch beim anormalen Atmungsvorgang. Es ist alsdann nötig zu prüfen, ob das Bariumion beim Phänomen der Virusbildung irgendeine Rolle spielt oder nicht. Deshalb haben wir die Seidenraupe mit Bariumoxyd oder Bariumchlorid versorgt. Die Versuche ergaben, dass das Chlorid eine Fähigkeit besitzt, die Larve in einen Virus-Krankheitszustand zu versetzen, während die Viruserkrankung derselben durch das Oxyd nicht beeinflusst wird. Obschon das virusbildende Vermögen des Bariumchlorides ziemlich schwach ist, ist ferner die Wirkung der Chloridverbindungen auf die Virusentstehung zu untersuchen. Es wurde deswegen schliesslich die Raupe mit Natriumchlorid bzw. Calciumchlorid gefüttert. Dabei stellte sich heraus, dass diese Verbindungen keine Krankheit hervorruft.

Durch die Versuche mit Bariumperoxyd konnte unsere Hydroperoxydtheorie der Virusbildung eine weitere wesentliche Stütze erhalten. Es wird jedoch angenommen, dass eine ausserordentlich grosse Anzahl Virosenarten im Pflanzen- und Tierreich nicht immer durch ganz gleiches Agens bewirkt zu werden brauchen. Ausser den Faktoren, die im Organismus eine Wasserstoffperoxydanhäufung und sodann eine Virusbildung verursachen, wirken auch einige andere, welche ebenfalls Viren erzeugen lassen, ohne dass sie eine übermässige Hydroperoxydentstehung herbeiführen. Dergleichen Mittel müssen eine Fähigkeit haben, entweder selbst auf die Eiweissmoleküle im Protoplasma als Denaturierungs- und Aggregationskatalysator zu wirken, oder als Katalysatoren zu

wirkende Substanzen, abgesehen von Hydroperoxyd, zu bilden. Ein Beispiel dafür bietet Bariumchlorid, obgleich es nur ein geringes diesbezügliches Vermögen besitzt. Wenn man denkt, dass die Wasserstoffperoxydbildung eine allgemeine biologische Erscheinung ist, so muss man sich natürlich vorstellen, dass eine Virusentstehung, an der das Wasserstoffperoxyd nicht beteiligt ist, ein Ausnahmephänomen darstellt. Auf jeden Fall ist es sehr bemerkenswert, dass wir einwandfrei erweisen konnten, dass die Viruserkrankung, welche im allgemeinen nur als Folge der Kontagion betrachtet worden ist, auch durch ungewöhnliche Stoffwechselvorgänge ohne Virusinfektion hervorgebracht wird.

I.

Zur Erhaltung noch kräftigerer Beweismaterialien für unsere Theorie der Neubildung des Virusproteins haben wir in der vorliegenden Untersuchung versucht, durch Einwirkung der Peroxyde selbst eine Viruskrankheit produzieren zu lassen. Obwohl es bekannt ist, dass das Wasserstoffperoxyd oder die anderen Peroxydverbiudungen auf einige organische Verbindungen, wie zum Beispiel Aldehyde, polymerisierend wirken, waren die Versuche zur experimentellen Erzeugung der eigentlichen Virosen mit der Hydroperoxydlösung erfolglos. Danach haben wir Metallperoxyde verwendet, welche in der wässerigen Lösung allmählich das Wasserstoffperoxyd entwickelten. Die Peroxyde der Alkalimetalle sind für diesen Zweck ungeeignet, denn sie werden zu heftig zersetzt. Nach einer Reihe von Vorversuchen wurde Bariumperoxyd gewählt und zwar die Untersuchung zunächst am Seidenwurm ausgeführt, weil unsere Erfahrungen lehrten, dass unter den von uns bisher benutzten Pflanzen und Tieren dieses Insekt am leichtesten an einer künstlichen Viruskrankheit erkrankt. Die Larven der Rassen (Japan 115 × Japan 12) × China 108 wurden nach der zweiten Häutung in mehrere Gruppen geteilt und mit Bariumperoxydlösungen von verschiedenen Konzentrationen benetzten Maulbeerblätter gegeben. Hin und wieder wurden die Atemgrösse sowie Katalasewirksamkeit der Raupen bestimmt (Tabelle I).

Bei einer Bariumperoxydkonzentration von mehr als m/5 wurde die Lebenstätigkeit der Larve ziemlich beeinträchtigt. Da die Wasserstoffionenkonzentration der Körperflüssigkeit des Seiden-

spinners bei etwa pH 6,5 liegt (11), kann das in den Raupenkörper aufgenommene Bariumperoxyd unter Abgabe des Wasserstoffperoxydes gespaltet werden. Der unerwartet hohe Prozentsatz der durch verwandtes Bariumsalz erkrankten Raupen wird dadurch erklärt, dass das infolge der durch die Peroxydfütterung bewirkten Atmungsstörung gebildete Wasserstoffperoxyd zusammen mit dem auf eben beschriebene Weise entstandenen auf das Protoplasmaeiweiss einwirkt.

Tabelle I.

Gefüttert mit:	m/10 BaO_2	m/20 BaO_2	Wasser
Relative Atmungsintensität	141	—	100
Relative Katalaseaktivität	61	—	100
Zahl der viruserkrankten Larven in %	70	55	0

II.

Es besteht die Möglichkeit, dass die in den obenerwähnten Versuchen beobachtete viruserzeugende Fähigkeit des Bariumperoxydes nicht auf der Wirkung des von diesem Salz herrührenden Hydroperoxydes, sondern auf derjenigen der Metallionen des Bariums beruht. Deswegen wurden in dieser Versuchsreihe die Larven mit Maulbeerblättern versorgt, die vorher mit Bariumsalzlösungen befeuchtet worden waren (Tabelle II).

Tabelle II.

Gefüttert mit:	m/8 BaO	m/8 $BaCl_2$	m/8 BaO_2	Wasser
Relative Atmungsintensität	104	108	121	100
Relative Katalaseaktivität	97	105	74	100
Zahl der viruserkrankten Larven in %	0	11	52	0

Durch die Einwirkung des Bariumchlorides von der angewandten Konzentration starben eine kleine Anzahl Raupen an einer Krankheit, welche nicht virusartig ist. Ausserdem wurden durch das Chlorid die Atmung sowie Katalase etwas erhöht. Aus den hier erhaltenen Befunden lässt sich schliessen, dass das Bariummetall selbst kein virusproduzierendes Vermögen hat.

III.

Im Anschluss an die Experimente mit dem Bariumchlorid haben wir schliesslich untersucht, ob durch das Chlorion eine Viruserkrankung bewirkt wird, indem wir die Seidenlarven mit Maulbeerblattern fütterten, die mit den Lösungen des Natrium-, Calcium- oder Bariumchlorides benetzt worden waren (Tabelle III).

Tabelle III.

Gefüttert mit:	m/15 NaCl	m/15 $CaCl_2$	m/15 $BaCl_2$	Wasser
Zahl der viruserkrankten Larven in %	0	0	7	0

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die oben beschriebene Aktivität des Bariumchlorides nicht auf die Wirkung des Halogenions zurückzuführen ist. Die in den vorliegenden Untersuchungsreihen mit den Bariumsalzen festgestellte Viruskrankheit war auf alle Fälle mit der in den bisherigen Arbeiten stets beobachteten Polyederviruskrankheit identisch. Wir konnten also mit Hilfe verschiedenartiger Mittel, unserer Theorie entsprechend, immer dieselbe Viruserkrankung herbeiführen.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Unterrichtsministeriums unterstützt.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Kyushu-Universität in Fukuoka, Japan)

Literatur

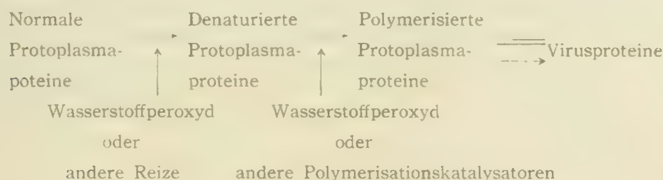
1) *K. Yamafuji* u. *T. Fujiki*, Biochem. Zs. **317**, 99, 1944.——2) *K. Yamafuji*, *K. So* u. *K. Soo*, ebenda **311**, 203, 1941.——3) *K. Yamafuji*, *K. So* u. *T. Kitano*, ebenda **315**, 415, 1943.——4) *K. Yamafuji*, *K. So* u. *K. Nagano*, ebenda **315**, 411, 1943.——5) *K. Yamafuji* u. *Y. Kosa*, ebenda **317**, 81, 1944.——6) *K. Yamafuji* u. *F. Yoshihara*, ebenda **317**, 87, 1944.——7) *K. Yamafuji* u. *Y. Shirozu*, ebenda **317**, 94, 1944.——8) *K. Yamafuji* u. *T. Cho*, ebenda **318**, 95, 1947.——9) *K. Yamafuji* u. *T. Fujiki*, ebenda **318**, 101, 1947.——10) *K. Yamafuji* u. *T. Yuki*, ebenda **318**, 107, 1947.——11) *K. Yamafuji*, Bull. agricult. chem. Soc. Japan **9**, 19, 1933.

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

VERHÜTUNG DER VIRUSERKRANKUNG DURCH EISENVERBINDUNGEN

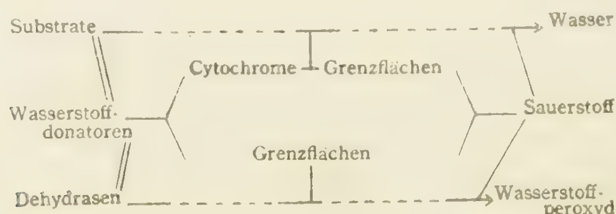
KAZUO YAMAFUJI UND TSUTOMU GOYA

Wirkt das Wasserstoffperoxyd auf das Nucleoprotein in der Zelle, so wird das Eiweissmolekül unter Umständen erst denaturiert und dann polymerisiert. Dies sind die Hauptvorgänge der Virusbildung und bildet die Grundreaktionen für unsere Virustheorie. Die Theorie der Virusentstehung wird als folgendermassen formuliert:



Eiweisskörper, die hauptsächlich bei diesen Vorgängen Denaturierung sowie Polymerisation erleiden, sind die Nucleoproteine im Protoplasma. Katalysator, der in den meisten Fällen derartige Veränderungen der Proteinnatur bewirkt, ist das Hydroperoxyd; aber es scheint möglich zu sein, dass bei komplexen Lebensprozessen andere Mittel entstehen, welche die gleichen Wirkungen ausüben. Die so aggregierten Proteinmoleküle bekommen nicht immer eine Virusnatur: Die Erlangung der Eigentümlichkeiten als Virusmolekül, die Spezifizität oder Eigenschaften der entstandenen Virusproteine und ferner die Differenzierung der Virusarten sind von dem Polymerisationsgrad des Protoplasmaeiweisses sowie der Empfindlichkeit des betreffenden Gewebes abhängig. Auf jenen Fall sind diese Erscheinungen grösstenteils von der Stärke der Hydroperoxydwirkung bedingt, und Wasserstoffperoxyd, das in solcher Weise stets bei den Entstehungsvorgängen des Virus

die wichtigste Rolle spielt, wird nach unserer Atmungstheorie fortwährend durch folgende Reaktion gebildet:



Wenn nämlich die Wasserstoffdonatoren mit den Sauerstoffmolekülen, die durch Grenzflächen allein aktiviert wurden, reagieren, so entsteht das Wasserstoffperoxyd. Derartige Sauerstoffaktivierung ist, wie wir schon oft bewiesen hatten, sehr kräftig, und folglich kann solche Hydroperoxydbildung als in allgemeiner biologischer Prozess betrachtet werden. Um die Einwirkung des Wasserstoffperoxyds auf die Protoplasmaproteine möglichst zu vermeiden, muss man daher entweder die Wirksamkeit der Cytochrome oder die der Katalase in der Zelle erhöhen. Das ist ein theoretischer Weg zur Vorbeugung und Heilung von Viruskrankheiten, aber wir wissen nicht, welcherweise wir die Voraussetzung verwirklichen. Es ist doch deutlich, dass die Viruserkrankung, wie aus den Gleichungen (1) und (2) anzunehmen ist, mit dem Eisenatom in enger Beziehung steht. Hier wird erstens die Möglichkeit gegeben, dass durch Fütterung mit reinem Katalasepräparat eine Virusentsteheng verhütet werden kann, obwohl es noch unklar ist, ob bei der Katalaseversorgung in der Tat eine Katalaseaktivierung im Protoplasm erfolgt. Die Annahme wurde jedoch bei den Versuchen am Seidenspinner bestätigt (1). Zweitens ist es auch möglich, dass wir durch Versorgung mit anderen Eisenverbindungen ebenfalls eine Virusbildung vorbeugen können. Dies ist die Frage, die wir uns in der vorliegenden Arbeit aufzuklären vornahmen.

Zu diesem Zwecke wurde zunächst die Wirkung der Häminsubstanzen auf tierische Viruskrankheit untersucht. Wird die Seidenraupe mit Blutpulver, Hämoglobin oder Hämin gefüttert und dann mit Virus infiziert oder erwärmt, so wird beobachtet, dass diese Substanzen das Auftreten der Virose etwas hemmen. Die hemmende Wirkung solcher Stoffe ist aber bedeutend schwacher

als die der Katalase. Die Ergebnisse sind nicht unerwartet; denn Hämoglobin ist für die Seidenlarve eine physiologisch fremde Substanz, und ausserdem ruft die Hämoglobinfütterung keine so deutliche Steigerung der Katalasewirksamkeit oder der Atmung des Insektes hervor. Es wurde deshalb auf den Einfluss der Eisensalze auf pflanzliche Virose untersucht. Düngt man die Tabakpflanze mit Ferro- oder Ferrisulfat und impft mit Virusprotein, so wird man finden, dass auch diese Salze auf die Viruserkrankung hemmend wirken. Die Wirksamkeit der Salze ist ebenfalls nicht so stark. Obgleich wir also nicht imstande waren, unter Benutzung der Eisenverbindungen die Erkrankung vollkommen zu verhüten, stützen die erhaltenen Befunde das oben angeführte Schema, das vor kurzem von uns für die Neubildung sowie Vermehrung der Virusmoleküle in der lebenden Zelle vorgeschlagen wurde. Das Wasserstoffperoxyd entsteht bekanntlich immer bei der Sauerstoffatmung, selbst wenn die Tätigkeit der Katalase oder des Cytochromsystems ausserordentlich erhöht würde. Das Protoplasmaeiweiss kann sonach niemals der Einwirkung des Wasserstoffperoxyds entgehen, und dies stellt, wie oben erwähnt, den ersten grundlegenden Vorgang der Virusbildung dar.

I.

Eine biologisch wichtige und leicht herstellbare Eisenporphyrinverbindung ist das Hämoglobin. Hämoglobin befindet sich im Blute der Vertebraten, aber es ist schwer, bei höheren Tieren ungezwungen und richtig eine Viruskrankheit entstehen zu lassen. Darum benutzten wir hier Seidenraupe, weil bei ihr der Entstehungsmechanismus des Virus im Körper fast vollständig geklärt worden ist. Das verwandte Hämoglobin wurde in n/20 NaOH gelöst und dann mit n/5 HCl vorsichtig neutralisiert, bis eine Fällung anfängt. Die Acidität der erhaltenen Lösung war pH etwa 9. Das pH entspricht demjenige des Verdauungssaftes der Seidenlarve. Die Maulbeerblätter wurden mit 1%iger Hämoglobinlösung benetzt und die benetzten Blätter jeden Tag einmal den Larven gegeben. Nach einer Woche wurden die Larven mit Blättern gefüttert, die mit einer Polyederviruslösung befeuchtet worden waren. Die benutzte Viruslösung wurde dadurch dargestellt, das viruskranke Raupen mit Sand zerrieben und mit Wasser versetzt wurden, warauf die Suspension nach dem Zentrifugieren

mit einem Bakterienfilter filtriert wurde. In den übrigen Fütterungszeiten wurden unbehandelten Blätter verabreicht.

Tabelle I.

Gefüttert mit:	Virus allein	Virus und Hämoglobin
Zahl der viruserkrankten Raupen % ...	32	24

Wie aus den Beziehungen zwischen der Hämoglobinfunktion und dem Insektenleben zu erwarten ist, erfolgt bei der Hämoglobinfütterung nur eine unvollkommene Verhütung gegen Virusansteckung. Da jedoch ein ziemlich günstiges Resultat erhalten werden konnte, wurden die Versuche ferner mit Blutpulver oder Hämin ausgeführt. Zur Bereitung des Blutpulvers wurde Ochserblut bei 60° getrocknet und pulverisiert. Als Hämin wurden verschiedene Präparate verwendet. Zuerst benutzten wir Lösungen, die durch Hydrolyse des Blutpulvers mit Säuren oder Alkalien hergestellt wurden. Die Häminlösungen wurden stets auf pH 8 bis 9 eingestellt.

Tabelle II.

Gefüttert mit:	Virus allein	Virus und Hämin
Zahl der viruserkrankten Raupen in %	20	14

Die Virusvermehrung im Raupenkörper wird auch durch Häminversorgung nicht völlig gehemmt. Hierbei war die Konzentration des Hämins unter 0,1%. Zur Kontrollgruppe wurde anstatt der Häminlösung eine Lösung gegeben, die die entsprechende Menge Salz enthält. Bei dem zugleich angestellten Versuch mit Blutpulver ergab sich, dass die hemmende Wirkung des Blutes selbst sehr schwach ist. Um aufzuklären, ob bei den Hemmungs-

Tabelle III.

Gefüttert mit:	Virus allein	Virus und Hämoglobin	Virus und Blutpulver	Virus und Hämin
Relative Katalaseaktivität	100	105	103	106
Relative Atmungsintensität	100	94	92	93

erscheinungen der Virusentstehung auch ein anomaler Stoffwechsel, der von unserer Virustheorie her zu erwarten war, stattfindet, bestimmten wir nun die Katalasewirksamkeit und Atmungsintensität der behandelten Larven.

Bei der Versorgung mit den Eisenpyrrolverbindungen erfolgen also sowohl eine Aktivierung der Katalase also auch eine Erniedrigung der Atmung im Gewebe der Raupen. Diese Verschiebung der Oxydationsprozesse ist diejenige, die für die Vorbeugung gegen Viruskrankheiten günstig ist. Der Verschiebungsgrad war aber zu niedrig, um einen genügend starken vorbeugenden Effekt auszuüben.

Die oben beschriebenen Befunde, die bei der Untersuchung über die Einwirkung des Eisens auf die Vermehrung des Virus gewonnen wurden, gaben uns Anlass, weiterhin die Wirkung des Hämatins auf die Neubildung des Virus zu untersuchen. Wie wir früher festgestellt haben, können wir dann bei der Seidenraupe eine Viruskrankheit ohne Virusinfektion entstehen lassen, wenn wir die Larven unter passenden Bedingungen erwärmen. Deshalb wurden die Larven in der oben angegebenen Weise mit Hämatin gefüttert und nach 3 Tagen 10 Minuten in einem Thermostat von 45° erwärmt. Hierbei benutzten wir als Hämatin ein Präparat, das von uns aus dem Ochsenblut nach der *Mörner*schen Methode (2) hergestellt wurde, oder dasjenige, das von Merck gekauft wurde und als "Hämin nach Mörner" bezeichnet worden ist. Diese Hämatinpräparate wurden als 0,03 bis 0,05%ige Lösung gegeben.

Tabelle IV.

Behandlungsweise:	Erwärmung allein	Erwärmung und Hämatinfütterung
Zahl der viruserkrankten Raupen in %	19	10

Füttert man die Raupe mit reinem Hämatin, so kann die Neubildung der Virusmoleküle im Raupenkörper viel stärker gehemmt werden, als bei der Fütterung mit unreinen Häminsubstanzen. Um zu prüfen, ob die Hemmung der Virusbildung tatsachlich auf die Verhinderung der Hydroperoxydanhaufung in der Zelle zurückzuführen ist, wurden wie üblich die Oxydationsvorgänge ermittelt.

Bei der Fütterung mit reinem Hämatin findet wie beim Rohhämin eine geringe Verminderung der Atemgrösse statt. Da dabei aber eine deutlich stärkere Erhöhung der Katalasewirkung bewirkt wird, können hierbei die Nucleoproteine bis zu einem gewissen Grad die Einwirkung des Wasserstoffperoxyds vermeiden, und dadurch wird die Viruserkrankung gehindert.

Tabelle V.

Behandlungsweise:	Erwärmung allein	Erwärmung und Hämatinfütterung
Relative Katalaseaktivität	100	135
Relative Atmungsintensität	100	97

II.

Um das Prinzip der Vorbeugung gegen die Viruskrankheiten zu verallgemeinern, wurde ferner die Pflanze als Material verwendet. In diesem Falle scheint es geeigneter zu sein, an Stelle von Häminproteiden anorganische Eisensalze als Vorbeugungsmittel zu geben. Zur Ermittelung des Erkrankungsgrades wurde erst die Zahl der Einzelherde bei *Nicotiana glutinosa* gezählt. Die Tabakpflanze wurde täglich mit der Ferrisulfatlösung versorgt und nach 10 Tagen mit den Virus verimpft.

Tabelle VI.

Behandelt mit:	Virus allein	Virus und n/250 $Fe_2(SO_4)_3$	Virus und n/500 $Fe_2(SO_4)_3$
Zahl der Einzelherde	55	38	42

Die Durchschnittszahl der produzierten Einzelherde ist bei der mit Eisen behandelten Pflanze geringer, als bei der unbehandelten. Das verwandte Ferrisulfat wirkt also auf die Viruserkrankung hemmend. Die Versuche wurden weiter mit *Nicotiana Tabacum* angestellt. n/100 bis n/1000 Lösungen von Ferro- oder Ferrisulfat wurden jeden Tag den Tabakpflanzen gegeben und nach 1 Woche die Viruslösung beimpft. Um die Wirksamkeit der Eisenverbindungen zu ermitteln, wurden die Latenzzeit bis zum

Auftreten der Krankheitssymptome sowie die Gesamtzahl der erkrankten Pflanzen bestimmt. Auch bei diesen Versuchen wurde die hemmende Wirkung des Eisens auf die Viruserkrankung festgestellt.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Unterrichtsministeriums gefördert.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Kyushu-Universitat
in Fukuoka, Japan)

Literatur

1) *Yamafuji* u. *Yuki*, Biochem. Zs. **318**, 107, 1947.——2) *Mörner*, Nordiskt Med. Arch. Festband, **1**, 1, 1896.

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

UEBER DIE EINWIRKUNG VON EISEN UND HYDROPEROXYD AUF POLYSACCHARIDE

KAZUO YAMAFUJI UND MUNEHIKO URAKAMI

Hydroperoxyd wird nach unserer Theorie fast immer in allen Zellen als Folge der Sauerstoffatmung gebildet. Das gebildete Peroxyd wird sofort durch Katalase gespaltet, und es ist möglich, die dabei frei gewordene Energie zu den Lebensvorgängen zu dienen. Ausserdem wirkt es auch als Oxydationsmittel. Obwohl das Wasserstoffperoxyd solche physiologisch günstigen Funktionen hat, ist es an sich ein Zellgift. Findet daher eine Anhäufung von Hydroperoxyd in der Zelle statt, so übt es auf die Stoffwechselprozesse ungünstige Wirkung aus. Als ein Beispiel dafür können wir die Tatsache anführen, dass das Wasserstoffperoxyd bei der Virusbildung eine wichtige Rolle spielt. Nämlich erfolgen nach unseren Untersuchungen eine Denaturierung sowie Polymerisation des Nucleoproteins, die für die Neubildung und Vermehrung des Virus unerlässliche Vorgänge sind, in den meisten Fällen unter katalytischer Wirkung des Hydroperoxyds (1). Wenn Hydroperoxyd wirklich als Katalysator bei der Eiweisspolymerisation wirken kann, so liegt es nahe anzunehmen, dass das Peroxyd bei der Bildung der Polysaccharide in den Pflanzenkörpern beteiligt ist. In den grünen Zellen wird wahrscheinlich, wie wir früher gezeigt haben (2), eine Hydroperoxydbildung auch durch Photolyse von Wasser bewirkt. Die so starke Bildung des Wasserstoffperoxyds in den chlorophyllhaltigen Geweben veranlasste uns zu der Vermutung, dass die Polymerisation oder Kondensation von Formaldehyd, das durch Reduktion von Kohlensäure entstanden ist, unter der Katalysatorwirkung des zugleich gebildeten Peroxyds vor sich geht. Da es aber sehr schwer ist, die synthetischen Prozesse im lebenden Organismus stufenweise zu verfolgen, haben wir hier die umgekehrten Reaktionen, die Zersetzungen der Poly-

saccharide, untersucht. Die Versuche ergaben, dass durch die kombinierte Wirkung von Eisen und Wasserstoffperoxyd sogar bei der Cellulose eine Zerlegung des Moleküls bewirkt wird, und zwar bei der Stärke sowie dem Xylan eine Bildung der Monosen.

I. Cellulose

Cellulose ist eine von den beständigsten Natursubstanzen, und Reagenzien, die eine Zersetzung von Cellulose hervorrufen, können stärker auf andere Polyosen einwirken. Daher wurden zunächst einige Versuche über die Cellulosezerlegung durch Wasserstoffperoxyd angestellt. Die Wirkung des Wasserstoffperoxyds verknüpft eng mit seinem Spaltungsvorgang; die Geschwindigkeit der Hydroperoxydspaltung durch Katalase ist aber zu gross, um die aktiven Spaltprodukte genügend lange mit den Stoffen im Reagensglas reagieren zu lassen. Wir haben jedoch in einer früheren Mitteilung nachgewiesen, dass Methylenblau unter Zusammenwirken von Wasserstoffperoxyd und Eisen reduziert wird (3). Die Methylenblauentfärbung wurde dabei durch Wasserstoff hervorgebracht, der bei der langsamen Spaltung des Wasserstoffperoxyds durch Eisen als Zwischenprodukt auftrat. Der Sauerstoff, der bei der Hydroperoxydzersetzung als Endprodukt freigemacht wird, kann die hochmolekularen Substanzen oxydativ zersetzen.

Es wird angenommen, dass eine vollständige Verzuckerung der schwer zersetzbaren Cellulose nur durch die Wasserstoffperoxydwirkung nicht hervorgerufen wird. Unsere Vorversuche, in denen das Zellstoffpulver unter verschiedenen Bedingungen mit einer Eisensalz enthaltenden Hydroperoxydlösung behandelt wurde, zeigten in der Tat, dass keine Bildung reduzierender Zucker selbst nach ziemlich langer Einwirkungsdauer erfolgt. Es ist aber bekannt, dass die relative Länge der Cellulosemoleküle beinahe mit der Viskosität ihrer Lösungen proportional ist. In der vorliegenden Arbeit haben wir deswegen zur Ermittelung des Zersetzungsgrades die Viskositätsmethode angewandt. Als Cellulose wurde sehr feines Pulver reines Filtrierpapiers benutzt. Zunächst wurde die Vergleichungsuntersuchung der Wirksamkeit verschiedener Eisensalze ausgeführt (Tabelle I). Nach der bestimmten Zeit wurde die Reaktionsmischung filtriert, der Rückstand zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol gut gewaschen und getrocknet. Die hier erhaltene,

teilweise zerlegte Cellulose wurde in einer Konzentration von 0,5% in der *Schweizer*schen Lösung, die nach *Gibson* dargestellt wurde (4), gelöst und die Viskosität in Wasserstoff mit dem *Ostwald*schen Apparat gemessen.

Tabelle I. Reaktionsmischung: 0,5 g Cellulose + 5 ccm n/10 Fe-Salz + 10 ccm n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 5 Stunden.

Fe-Salz:	$FeCl_2$	$FeCl_3$	$FeSO_4$	$Fe_2(SO_4)_3$
Relative Vikosität	1,664	1,570	1,576	1,525

Bei der Hydroperoxydlösung wurden nach dem anfänglichen Zusatz von 10 ccm alle 30 Minuten weitere 5 ccm hinzugefügt. Die Zahlen in Tebelle I lehren, dass die beiden Salze, Chloride und Sulfate von Eisen, eine Fähigkeit haben, unter Mitwirkung von Wasserstoffperoxyd das Cellulosemolekül zu spalten. Bei den Kontrollversuchen, in denen Eisensalze allein oder Wasserstoffperoxyd allein einwirken gelassen wurden, wurde fast keine Viskositätserniedrigung beobachtet. Die relative Viskosität der unbehandelten Cellulose war 2,105.

Es wurde dann der Einfluss der Wasserstoffionenkonzentration auf derartige Peroxydasewirksamkeit untersucht (Tabelle II). Da wir bei den Vorversuchen gefunden haben, dass der Phosphatpuffer die Viskositätsmessung stört, wurde das pH der Reaktionsmischung mit verdünnter Natriumhydroxydlösung eingestellt. Die Natur der Cellulose wird aber leicht durch Alkali geändert. Sonach wurde beim pH über 9 das Glykokollgemisch verwendet.

Tabelle II. Reaktionsmischung: 0,5 g Cellulose + 2 ccm n/10 Ferrisulfat + 10 ccm n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 5 Stunden.

pH	Relative Viskosität	pH	Relative Viskosität	pH	Relative Viskosität
3,0	1,552	6,0	1,616	9,0	1,878
4,0	1,567	7,0	1,621	10,0	1,745
5,0	1,605	8,0	1,583	11,3	1,725

Beim Mischen von Ferrisulfat mit Natriumhydroxydlösung entsteht ein Niederschlag von Eisenhydroxyd, der ebenfalls auf die Viskositätsermittelung störend wirkt. Deswegen wurde nach

der Reaktionszeit 1 ccm 5 n Schwefelsäure zugesetzt und die Cellulose schnell abfiltriert, wodurch der Niederschlag aufgelöst und entfernt wurde. Wie Tabelle II zeigt, findet die Cellulosezersetzung mit Zunahme der Acidität oder Alkalität in grösserem Masse statt. Da der Zerlegungsgrad der Cellulose durch die Salzarten in der Reaktionslösung beeinflusst wird, können wir die Werte beim pH-Bereich unter 8 direkt mit denen beim pH-Bereich über 9 nicht vergleichen. Bei den Kontrollversuchen wurde festgestellt, dass nur durch H- oder OH-Ionen von entsprechenden Konzentrationen keine erkennbare Spaltung des Cellulosemoleküls bewirkt wird.

Ferner wurde die Beeinflussung der Cellulosezersetzung durch die Temperaturerhöhung untersucht (Tabelle III). Die Viskositätsmessung wurde aber wie gewöhnlich bei 30° durchgeführt.

Tabelle III. Reaktionsmischung: 0,5 g Cellulose+2 ccm n/10 Ferrisulfat+ 10 ccm n H_2O_2. Reaktionsdauer: 3 Stunden.

Reaktionstemperatur:	30°	45°	60°
Relative Viskosität	1,573	1,529	1,466

Die Viskosität der Celluloselösung nimmt mit der Steigerung der Temperatur des Reaktionsgemisches ab. Bei 60° wird jedoch die Cellulose durch die Einwirkung des Ferrisulfats allein, besonders durch die des Wasserstoffperoxyds, etwas zersetzt.

Die Cellulosezerlegung ist also hauptsächlich auf die Hydroperoxydwirkung zurückzuführen; die Eisensalze wirken in der Regel nur als Katalysatoren. Dementsprechend muss die Viskositätsverminderung von der Wasserstoffperoxydkonzentration abhängig sein. Die Ergebnisse derartiger Versuche enthält Tabelle IV.

Tabelle IV. Reaktionsmischung: 5,0 g Cellulose+2 ccm n/10 Ferrisulfat+5 ccm n/20 bis n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 3 Stunden.

H_2O_2 Konzentration:	n	n/2	n/5	n/10	n/20
Relative Viskosität	1,575	1,638	1,697	1,915	1,922

Bei diesen Versuchen wurden wie üblich alle 30 Minuten 5 ccm Hydroperoxydlösung zugesetzt. Die Versuche lassen erkennen,

dass die Cellulose im Verhaltnis zur Hydroperoxydmenge starker zerlegt wird und weiter, dass die Cellulosezerlegung bei der Hydroperoxydkonzentration unter n/10 nicht mehr erfolgt.

Wenn die Eisensalze in der Hauptsache als Katalysatoren zur Wasserstoffperoxydspaltung dienen, so genügt eine vehaltnismässig kleine Quantität Salze, die Reaktion zu bewirken. Bei den Versuchen in Tabelle V wurden deshalb variierte Mengen Ferrisultat hinzugefügt.

Tabelle V. Reaktionsmischung: 0,5 g Cellulose+0,1 bis 3,0 ccm n/10 Ferrisulfat+ 5 ccm n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 3 Stunden.

Ferrisulfat in ccm:	3,0	1,5	1,0	0,5	0,3	0,1
Relative Viskosität...........	1,555	1,557	1,563	1,559	1,587	1,849

Unter den Versuchsbedingungen in Tabelle V ist der Ferrisutfatzusatz über 0,3 ccm unnötig. Wahrscheinlich ist der Zerlegung der Cellulosemoleküle durch unmittelbare Wirkung des Eisens sehr gering; die Beschleunigung der Cellulosezersetzung durch Eisensalze beruht mittelbar auf der Förderung der Hydroperoxydspaltung durch dieselben.

Hämoglobin hat ebenfalls eine wasserstoffperoxydspaltende Fähigkeit. Die Viskositätsermittelung wird aber durch Hämoglobinzusatz gestört. Die Cellulose erfuhr keine Zersetzung, selbst als man unter den obigen Bedingungen 10 ccm n Schwefelsäure anstatt Ferrisulfatlösung hinzufügte. Würde jedoch die Hydroperoxydlösung in der üblichen Weise zur schwefelsauren, eisenfreien Reaktionsmischung zugesetzt, so findet eine ziemlich starke Zerlegung der Cellulose statt.

II. Stärke und Xylan

Wie wir in den oben erwähnten Versuchen festgestellt haben, wird das Cellulosemolekül bis zu einem gewissen Grade durch Zusammenwirken von Eisen und Wasserstoffperoxyd gespaltet. Es ist daher anzunehmen, dass Eisen und Wasserstoffperoxyd auf das Stärkemolekül eine kräftigere Wirkung ausüben. Diesbezügliche Untersuchungen wurden schon von *Biedermann* (5) und *Omori* (6) ausgeführt. Doch verfolgten sie den Stärkeabbau nur

mittels einer Jodfarbenreaktion. Wir haben hier untersucht, ob in solchem Falle eine Zuckerbildung hervorgebracht wird (Tabelle VI).

Tabelle VI. Reaktionsmischung: 10 ccm 2 %ige Stärkelösung + 20 ccm m/5 Accetatpuffer + 0,5 ccm n/10 Ferrisulfat + 5 ccm n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 120 Minuten.

pH:	3,6	5,2	6,2
Glucose in mg	13	8	6

Da das Wasserstoffperoxyd auf die Zuckerbestimmung nach *Bertrand* störend wirkt, wurde die Reaktionsmischung nach der Reaktion mit m/15 sekundärem Natriumphosphat neutralisiert und dann mit kristallisierter Katalase aus der Rinderleber versetzt. Tabelle VI zeigt, dass, wie erwartet, eine Verzuckerung stattfindet. Bei den anderen Zusatzversuchen wurde gefunden, dass bei den gleichen Wasserstoffionenkonzentrationen durch das Hydroperoxyd allein eine geringere Zuckerbildung hervorgerufen wird. Die Versuche wurden ferner mit verschiedenen Pufferlösungen angestellt und ergaben immer ähnliche Ergebnisse.

Schliesslich wurde geprüft, ob durch eine derartige peroxydatische Wirkung auch eine Verzuckerung von Xylan bewirkt wird (Tabelle VII).

Tabelle VII. Reaktionsmischung; 5 ccm 1 %ige Xylanlösung + 10 ccm Pufferlösung + 1 ccm n/10 Ferrisulfat + 30 ccm n H_2O_2. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 22 Stunden.

Puffer:	n/10 Glykokoll-HCl von pH 2,3	m/5 Acetat von pH 6,4
Xylose in mg	22	17

Die Daten in Tabelle VII sind einige Beispiele aus einer Reihe von Versuchen. Das Xylan ist schwerer zersetzbar als die Stärke, ergibt aber beim Zusammenwirken von Eisen und Hydroperoxyd die Pentose.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Unterrichtsministeriums gefördert.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Kyushu-Universitat in Fukuoka, Japan)

Literatur

1) *K. Yamafuji* u. *T. Cho*, Jl. agricult. chem. Soc. Japan **20**, 411 (1944).——2) *K. Yamafuji* u. Mitarbeiter, Biochem. Zs. **296**, 348 (1938); **298** 293 (1938); **301**, 61 (1939); **303**, 60 (1939); **303**, 260 (1939); **304**, 160 (1940); **305**, 354 (1940); **306**, 24 (1940).——3) *K. Yamafuji, K. So* u. *H. Takaishi*, ebenda. **308**, 29 (1941).——4) *W. Gibson, L. Spencer* u. *R. McCall*, Jl. chem. Soc. **117**, 479 (1920).——5) *W. Biedermann* u. *C. Jenerkoff*, Biochem. Zs. **149**, 309 (1924).——6) *T. Omori*, Jl. Biochem. **14**, 331 (1931).

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

UEBER DEN ERNÄHRUNGSWERT VON XYLAN

KAZUO YAMAFUJI UND SHIGERO SHIBATATE

Wie wir in der vorhergehenden Arbeit festgestellt haben (1), wird Xylan verhältnismässig leicht durch Zusammenwirken von Wasserstoffperoxyd und Eisen zersetzt. Unsere Atmungstheorie, die auf der von uns gefundenen Tatsache der Sauerstoffaktivierung durch Zellgrenzflächen beruht, lehrt, dass das Wasserstoffperoxyd bei den verschiedenen Wegen des terminalen Prozesses der Gewebsatmung gebildet wird. Und vielen Tieren können faserige Stoffe, die meist eine grosse Menge Xylan enthalten, als Nahrungsmittel dienen. Cellulose, die bei den fasrigen Substanzen den Hauptbestandteil darstellt, ist aber gegen biologische Zersetzungen äusserst widerstandsfähig. Folglich ist anzunehmen, dass Xylan, das in der Pflanzenwelt so weitverbreitet vorkommt und so leicht durch biologische Verfahren verzuckert werden kann, ein wichtiger Bestandteil ist, der für pflanzenfressende Tiere Lebensenergie liefert.

Ein typisches Beispiel dafür geben die Lebensvorgänge der Termite, die nur Holz frisst und ein normales Leben führt. Wirklich ergaben unsere Versuche, dass das Verdauungsorgan dieses Insektes eine bedeutend grössere Verzuckerungsfähigkeit für Xylan hat, als für Cellulose. Auch das Rind frisst eine beträchtliche Menge Stroharten. Wir konnten feststellen, dass im Digestionssaft dieses Pflanzenfressers ebenfalls eine sehr starke Xylanase existiert. Andererseits befindet sich im Verdauungskanal der weissen Ratte fast keine oder nur wenige Xylanase. Daher muss bei solchen Tieren Xylose anstatt Xylan gegeben werden. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde durch einige Fütterungsversuche bestätigt, bei denen die Ratte mit einem durch Hydrolyse xylanhaltiger Stoffe hergestellten Futter versorgt wurde.

I. Verdauungsenzyme der Termite

Holz, das die einzige Nahrung der Termite ist, enthält über 50% Cellulose. Die Termite kann sogar von Cellulose allein leben. *Cleveland* klärte diese merkwürdige Lebensfunktion des genannten Insektes auf; nach ihm wohnen im Verdauungstraktus desselben zahlreiche Protozoen, die die Fähigkeit besitzen, Cellulose zu zerlegen, und weiter nach dem Tod als Stickstoffquelle für den Wirt dienen (2). Nach *Trager* ist es sehr schwer, aus dem Digestionsapparat der Termite eine starke Cellulase zu isolieren (3). Um die cellulosezersetzende Wirksamkeit möglichst deutlich zu verfolgen, benutzten wir eine Termite, die in einem saftfreien dürren Holz lebt. Für die Prüfung, ob in der Tat das Holz im Termitenkörper zersetzt wird, wurde der Verdauungssaft mit *Swezy*scher Nährlösung versetzt, auf einem Objektglas fixiert und mit einer Phloroglucinlösung gefärbt. Die dabei verwendete Nährlösung bestand aus 0,3 g NaCl, 0,02 g $CaCl_2$, 0,02 g KCl, 0,01 g $MgCl_2$, 0,01 g $NaHCO_3$, 0,01 g NaH_2PO_4, 0,5 g Blutpulver und 100 ccm Wasser; die Phloroglucinlösung aus 12 g Phloroglucin, 50 ccm 24%iger Salzsäure und 50 ccm Wasser. Bei der Mikroskopierung dieses Präparates wurde beobachtet, dass viele Holzstückchen von den Protozoen aufgenommen wurden. Die Holzstücke im Protozoenkörper können durch Rotfärbung von Lignin nachgewiesen werden. Die Frage, ob tatsächlich in der Protozoenzelle eine Cellulosezerlegung vor sich geht, ist noch nicht einwandfrei entschieden.

Zur Bestimmung der Cellulase wurde dem Insekt vorsichtig das Verdauungsorgan entnommen. Der als Substrat zu benutzende Zellstoff ist in Wasser unlöslich, deswegen muss er zur vollständigen Berührung mit dem Enzym möglichst fein pulberisiert werden. Zu diesem Zwecke wurde reines Filtrierpapier bei etwa 60° getrocknet, pulverisiert und weiter mit Quarzsand gut zerrieben. Zugleich wurde die cellulosezersetzende Kraft des ganzen Termitenkörpers, einschliesslich des Verdauungsorgans, ermittelt. Bei der Enzymbestimmung wurden beide, der Insektenkörper und das Digestionsorgan, als Gewebebreie verwendet, ohne dass das Enzym isoliert oder gereinigt wurde. Wegen der einfachen Vergleichung mit der Verzuckerungskraft anderer Polyasen und ferner wegen des allgemeinen Mitvorhandenseins der Polyasen mit ent

sprechenden Oligasen, wurde die Menge reduzierender Zucker, die nach *Bertrand* bestimmt wurde, in mg Glucose ausgedrückt.

Tabelle I. Reaktionsmischung: 0,2 g Cellulose + 2 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 6,8 + 1 ccm Gewebebrei + 20 ccm Wasser. Reaktionstemperatur: 38°. Reaktionsdauer: 21 Stunden.

	Verdauungskanal	Termitenkörper
Glucose in mg	2,0	11,0

Bei den Versuchen in Tabelle I wurden 100 Individuen benutzt; das Gesamtgewicht der Körper war 0,14 g und das der Verdauungskanäle 0,08 g. Es ist undenkbar, dass in den anderen Geweben ausser dem Digestionsorgan die Cellulase vorkommt. Wahrscheinlich hat sie ziemlich geringe Widerstandskraft gegen äussere Faktoren. Da das Entnehmen der Verdauungskanäle einige Zeit dauert, besteht die Möglichkeit, dass während dieser Zeit die Aktivität der Cellulase allmählich herabsinkt. In der Tat erfolgt bei längerer Reaktionsdauer keine Zunahme der Zuckermenge. Die Abhängigkeit der Cellulasewirksamkeit von der Wasserstoffionenkonzentration wurde mit dem Brei des ganzen Insektenkörpers ermittelt.

Tabelle II. Reaktionsmischung: 0,3 g Cellulose + 5 ccm m/5 Phosphatpuffer + 1 ccm Gewebebrei + 20 ccm Wasser. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 16 Stunden.

pH:	5,6	5,9	6,5	6,8	7,2	7,7
Glucose in mg	7,0	7,4	8,2	8,3	4,0	1,5

Das Reaktionsoptimum der Termitencellulase liegt, wie die Daten in Tabelle zeigen, bei pH etwa 6,6. Dieser Wert entspricht dem pH des Verdauungssaftes der Termite. Die Termitencellulase ist in sauer Lösung verhältnismässig beständig, dagegen in alkalischer unbeständig.

Das verzuckernde Vermögen dieses Insektes für die Cellulose, deren Gehalt im Holz am höchsten ist, ist also, wider Erwarten, bedeutend klein. Der Bestandteil, dessen Menge nächst der Cellulose am grössten ist, ist Lignin. Lignin kann aber im allgemeinen in pflanzlichen sowie tierischen Körpern nicht leicht hydrolysiert

werden, und überdies haben seine Hydrolysenprodukte fast keinen Nahrungswert. Pentosan steht im Prozentsatz unter den Holzbestandteilen an dritter Stelle, und es besteht grösstenteils aus Xylan. Deshalb wurde angenommen, dass das Xylan im Digestionsorgan der Termite zersetzt und von der Wand desselben absorbiert wird; eine Annahme, die bisher von niemandem geäussert worden ist. Das verwandte Xylan wurde aus Reisstroh dargestellt. Zuerst wurde das Strohpulver mit 2%igem Ammoniak behandelt und dann mit 7%iger Natriumhydroxydlösung extrahiert. Der Alkaliextrakt wurde mit Alkohol versetzt, die hier erhalten Fällung wieder in Alkali gelöst und nochmals mit Alkohol gefällt. Diese Prozeduren wurden noch mehrmals wiederholt. Der letzte Niederschlag wurde schliesslich mit salzsäurehaltigem Alkohol neutralisiert, gewaschen und getrocknet. Als Enzymmaterial wurde ebenfalls der Brei aus 100 Insektenkörpern benutzt.

Tabelle III. Reaktionsmischung: 20 ccm 3%ige Xylanlösung + 5 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 6,8 + 1 ccm Gewebebrei. Reaktionstemperatur: 38°. Reaktionsdauer: 20 Stunden.

	Verdauungskanal	Termitenkörper
Xylose in mg	6,4	18,7

Vergleicht man die Zahlen in Tabelle III mit denen in Tabelle I, so ersieht man, dass im Termitenkörper, wie erwartet, die Xylanaseaktivität sehr viel höher ist, als die Cellulaseaktivität. Es ist dazu zu bemerken, dass die Termitenxylanase, wie Tabelle IV zeigt, bei pH 5,3 am stärksten wirkt und folglich beim pH-Wert wie in den obigen Versuchen ihre Fähigkeit nicht völlig beweist.

Tabelle IV. Reaktionsmischung: 20 ccm 2%ige Xylanlösung + 5 ccm m/15 Phosphatpuffer + 1 ccm Gewebebrei. Reaktionstemperatur: 39°. Reaktionsdauer: 22 Stunden.

pH:	5,0	5,3	5,6	5,9	6,5	6,8	7,4
Xylose in mg	22,0	22,4	21,1	19,0	12,8	8,7	6,8

Im Verdauungsorgan der Termite leben neben den Protozoen noch zahlreiche Bakterien. Wir haben jedoch keinen Anhaltspunkt,

ob das xylanverzuckernde Vermögen von den Mikroben herrührt, oder der Termite eigentümlich ist.

Im Holz kommt keine oder nur eine äusserst geringe Menge Stärke vor. Demnach kann man vermuten, dass die Amylasewirksamkeit der Termite schwach sei. Die Versuche in Tabelle V lehren aber, dass das Insekt eine bedeutene starke Amylase hat.

Tabelle V. Reaktionsmischnng: 100 ccm 5%ige Starkelösung + 6 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 6,8 + 1 ccm Gewebsbrei. Reaktionstemperatur: 39°. Reaktionsdauer: 22 Stunden.

	Verdauungskanal	Termitenkörper
Glucose in mg	52,8	142,0

Es ist unmöglich, dass die Termite die Hauptquelle für ihre Lebensenergie in den Stärkeabbauprodukten sucht. Vielleicht ist die Verdauungsamylase des Insektes in den Mikrobenkörpern im Verdauungssaft vorhanden und an der Bildung sowie Zersetzung des Glycogens der Mikroben beteiligt. Der Einfluss der Acidität auf die Termitenamylase wurde durch die Versuche in Tabelle VI aufgeklärt.

Tabelle VI. Reaktionsmischung: 90 ccm 5%ige Stärkelösung + 10 ccm m/15 Phosphatpuffer + 1 ccm Gewebebrei. Reaktionstemperatur: 37°. Reaktionsdauer: 21 Stunden.

pH:	5,9	6,5	6,8	7,2	7,7
Glucose in mg	230	260	240	220	200

Die optimale Acidität für die Amylasewirkung stimmt mit derjenigen für die Cellulasewirkung überein. Das amylolytische Ferment kommt, von der Cellulase oder Xylanase abweichend, wahrscheinlich auch in verschieden Geweben der Termite vor und nimmt am Glycogenstoffwechsel im Ameisenkörper Anteil.

Um noch eingehendere Kenntnisse von den Eigentümlichkeiten der Termitenpolyasen zu gewinnen, haben wir viele Versuche zur Isolierung der Protozoen aus dem Verdauungsorgan gemacht. Zum Beispiel wurden verschiedene Nährlösungen, wie Strohextrakt, Heuextrakt und Salzgemische, unter wechselnden Konzentrationen sowie pH-Werten verwendet. Die Protozoen stellen selbst unter

den günstigsten Bedingungen innerhalb einer Stunde ihre Bewegung ein und sterben innerhalb einiger Stunden. Wir konnten also keine Reinkultur der Termitenprotozoen erhalten.

2. Verdauungsenzyme des Rindes

Das Reisstroh bildet in Japan das wichtigste Futter für die Haustiere. Der erste und grösste Magen des Rindes, der Pansen, ist immer mit Reisstroh angefüllt. Im Pansen müssen daher die Strohbestandteile zersetzt und die Zersetzungsprodukte von der Wand des Verdauungsorgans aus absorbiert werden. Substanz, die im Stroh am reichsten vorhanden ist, ist ebenfalls Zellstoff. Deswegen wurde zuerst die Pansencellulase untersucht. Der Pansensaft ist sehr zäh und nicht filtrierbar. Nach der Entfernung fester Körper wurde der Pansensaft unfiltriert als Enzymlösung benutzt.

Tabelle VII. Reaktionsmischung: 0,2 g Cellulose+5 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 7,7+5 ccm Pansensaft+20 ccm Wasser. Reaktionstemperatur: 40°.

Reaktionsdauer in Std.:	24	110
Glucose in mg	2,5	9,0

Bei den Versuchen in Tabelle VII wurde die Wasserstoffionenkonzentration der Reaktionsmischung auf diejenige des Pansensaftes eingestellt. Aus den erhaltenen Dates geht hervor, dass die cellulosezersetzende Fähigkeit des ersten Magens des Rindes äusserst niedrig ist. Es besteht also die Möglichkeit, dass sich im Stroh irgendeine Substanz befindet, die vom Rind besser als Cellulose ausgenutzt wird. Das Reisstroh enthält Xylan zu etwa 25%. Auf Grund der Erfahrungen an Termite nahmen wir an, dass im Rindermagen ein recht wirksames xylanspaltendes Enzym vorkommt und die entstandene Xylose zur Wärmequelle für das Rind dient. Demnach wurde hier die Xylanasewirksamkeit des Pansensaftes geprüft.

Die Xylanaseaktivität des Pansens ist, wie erwartet, beträchtlich hoch. Tabelle VIII zeigt auch, dass die Wirkung der Pansenxylanase bei pH 6,2 am stärksten ist. Andere Zusatzversuche lehrten ferner, dass das Temperaturoptimum dieses Enzyms bei etwa 40° liegt. Um die Frage zu lösen, ob die ermittelte Xylanase

ein eigentliches Gewebsferment des Rindes ist, haben wir dann ein Trockenpräparat der Pansenwand dargestellt. Die Pansenwand wurde zerrieben, mit Aceton behandelt und hierauf im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Dieses Präparat besass kein xylanverzuckerndes Vermögen. Im Pansensaft wohnnen, wie bei der Termite, verschiedenartige Mikroorganismen, insbesondere eine grosse Anzahl Bakterien. Daraus wird der Schluss gezogen, dass die Xylanasewirkung nicht aus dem Pansengewebe, sondern aus den Mikroben im Pansensaft stammt.

Tabelle VIII. Reaktionsmischung: 0,3 g Xylan+10 ccm m/15 Phosphatpuffer +1 ccm Pansensaft+20 ccm Wasser. Reaktionstemperatur: 40°. Reaktionsdauer: 23 Stunden.

pH:	5,3	5,9	6,2	6,4	6,8	7,4	7,7	8,0
Xylose in mg	25,4	26,8	31,1	29,3	27,5	21,5	21,3	20,4

Dem Rind wird täglich ausser den Stroharten noch eine ziemliche Menge Getreiden gegeben, deren Hauptbestandteil Stärke ist. Deshalb muss die Amylase ein wichtiges Verdauungsenzym dieses Tieres sein. Die Versuche ergaben in der Tat, dass ein starkes amylolytisches Ferment sowohl im Pansensaft als auch in der Pansenwand vorhanden ist (Tabelle IX).

Tabelle IX. Reaktionsmischung: 40 ccm 5%ige Starkelösung+5 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 7,7+1 ccm Pansensaft oder 2 g Pansenwand. Reaktionstemperatur: 38°. Reaktionsdauer: 24 Stunden.

	Pansensaft	Pansenwand
Glucose in mg	54,5	58,6

Under den Polyasen des Rinderpansens hat die Amylase die grösste Wirksamkeit. Die Amylase befindet sich in den äusseren sowie inneren Teilen der Pansenwand und kann aus der Wand mit Wasser extrahiert werden. Das optimale pH dieser Amylasereaktion liegt, dem der Xylanasewirkung entsprechend, bei 6,2.

Der Rinderpansen muss selbstverständlich auch eine eiweisszerlegende Fähigkeit besitzen. Die Protease wurde hier nach *Willstätter* bestimmt.

Tabelle X. Reaktionsmischung: 40 ccm 6%ige Caseinlösung + 5 ccm m/15 Phosphatpuffer von pH 7,7 + 5 ccm Pansensaft. Reaktionstemperatur: 40°. Reaktionsdauer: 24 Stunden.

	In 50%igem Alkohol	In 95%igem Alkohol
Aciditatszunahme in ccm n/5 KOH...	5,27	6,40

Aus Tabelle X geht hervor, dass im Pansen, obgleich er eine Art Magen ist, eine ziemlich starke Protease vorkommt.

3. Fütterungsversuche mit der Ratte

Die obigen Untersuchungen deuten also an, dass für Tiere, die gewöhnlich stärkearme Pflanzenstoffe als Futter aufnehmen, das Xylan die beste Energiequelle darstellt. Infolgedessen wird angenommen, dass auch für Tiere, die verschiedene Stoffe fressen, das Xylan als Nährmittel dienen kann, wenn es vorher zersetzt wurde. Ist das der Fall, so sind die Versuche, aus Stroharten, Hölzern und anderem in einfacher Weise irgendein Nahrungsmittel oder Futter zu bereiten, sehr hoffnungsvoll. Denn Xylan, dessen Gehalt in derartigen faserigen Stoffen ziemlich hoch ist, ist bedeutend leichter zersetzbar als Cellulose. Ueber den Wert der Xylose als Wärmequelle im tierischen Körper begegnen wir in der Literatur sich widersprechenden Angaben. So gaben *Cremer* (4) und *Thomas* (5) an, dass durch Xylosefütterung bei Kaninchen sowie bei Hühnern eine Bildung von Glycogen in der Leber bewirkt wird. Dagegen erfolgt nach *Frenzel* (6) bei der Xyloseversorgung keine Glycogenbildung im Kaninchenkörper. Neuerdings teilte *Iwata* (7) in einer Reihe von Arbeiten mit, dass als Folge der Pentosanaufnahme durch Pflanzenfresser in den Muskeln oder in der Leber derselben einigermassen Fett und Glycogen gebildet werden. Es scheint natürlich zu sein, dass in den Körpern der xylanasereichen Tiere die Xylose in Körpersubstanzen umgewandelt wird. Die nächste zu lösende Frage ist die, inwieweit xylanasearme oder xylanasefehlende höhere Tiere und Menschen Xylan sowie Xylose als Quelle ihrer Lebensenergie ausnutzen können. Für diese Untersuchung bildet das Reisstroh eins der geeignetsten Materialien; denn in Japan wird es jedes Jahr in übermässiger Fülle produziert und dient dort verschiedenen Haustieren als

Futter. Zuerst muss der Wert des unbehandelten Reistrohs bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurde unpolierter Reis in verschiedenen Prozentsätzen mit dem Strohpulver gemengt und an Ratten verfüttert.

Tabelle XI. Futtermischung: Reis 45~95% + Fischmehl 5% + Reisstroh 50~0%. Futterbestandteil: Rohprotein 8,46~13,99%, Stickstoffreie-Extraktstoffe 60,10~85,79%, Rohfett 2,25~2,72%, Rohfaser 0,84~17,30%, Asche 1,23~9,48%.

Versuch	Strohmenge in %	Anfangskörpergewicht der Ratte in g	Endkörpergewicht der Ratte in g	Körpergewichtszunahme der Ratte in g	Aufgenommene Futtermenge während ver Versuchsdauer in g
1	0	90	141	51	1240
	5	94	144	50	1230
	10	112	163	51	1215
	20	102	158	56	1260
2	0	57	158	101	1260
	15	58	161	103	1250
	30	60	158	98	1550
	50	62	160	98	1710

Die Fütterungsexperimente wurden immer vom Standpunkte der chemischen Analyse sowie der Ernährungsmethode aus möglichst in eingehender Weise durchgeführt. Hier werden jedoch nur kurz einige Auszüge aus zahlreichen Daten beschrieben. Auch bei den Versuchen mit dem unbehandelten Stroh wurden nur die wesentlichen Ergebnisse in Tabelle XI zusammengestellt. Das Körpergewicht und die Futtermenge sind die Durchschnittswerte der Weibchen. Aus den erhaltenen Zahlen erkennt man, dass das Reisstroh in diesem Zustand eine ziemlich hohe Ernährungsfähigkeit besitzt. Die Ratte wächst normal heran, selbst wenn die Hälfte der Futtermischung aus dem Strohmehl besteht. 1st der Strohgehalt des Futters unter 20%, so sind Wachstumsgeschwindigkeit des Tieres sowie aufgenommene Futtermenge beinahe gleich wie beim Grundfutter ohne Stroh. Beträgt aber der Strohgehalt über 30%, so frisst das Tier die Futtermischung um etwa den gemischten Prozentsatz des Strohmehls mehr als ungemischtes Grundfutter allein, um mit dem Wachstum des Kontrolltieres Schritt zu halten. Der so hohe Nährwert des Reisstrohs beruht wahrscheinlich nicht nur auf seinem grossen Xylangehalt, sondern

auch auf seiner krautigen Natur. Da nämlich die Reispflanze eine Art Gras ist, wird es in der Form des ganzen Pflanzenkörpers, abgesehen von der Wurzel, den Haustieren gegeben. Das Strohfutter enthält demnach verschiedene Pflanzenteile besonders Blätter, und an nahrhaften Bestandteilen, besonders Eiweiss und Vitamine. Die Analyse des Reisstrohs ergab in der Tat: Rohprotein 5,64%, Stickstoffreie-Extraktstoffe 36,40%, Rohfett 1,33%, Rohfaser 37,13% and Asche 19,50%. Wie aus unseren Befunden an Verdauungsenzymen der Termite oder des Rindes ersichtlich ist, wird der Ernährungswert des Reisstrohs noch erhöht, wenn das darin befindliche Xylan im voraus verzuckert wurde.

Für das Zweck der Umwandlung der Strohmaterialien in nahrhaftere Futter oder Nahrungsmittel sind kostbare Apparate und Verfahren nicht praktisch. Um möglichst einfache Methoden zu finden, wurden die Versuche unter verschiedenen Bedingungen angestellt. Bei den Methoden, die bisher von vielen Forschern angeführt wurden, wurden faserige Stoffe nach der Behandlung mit Säuren oder Alkalien gewaschen und erhaltene Rückstände zu den Tierexperimenten verwendet. Nach solchen Prozeduren werden aber leicht zersetzbare, folglich auch leicht absorbierbare lösliche Substanzen entfernt. Deshalb haben wir in der verliegenden Arbeit fast immer nach der Zersetzung des Strohs neutralisiert und die wasserlösliche Substanzen enthaltenden Präparate dargestellt. Vorläufige Versuche zeigen, dass der grösste Teil des Xylans im Reisstroh durch verhältnismässig milde chemische Mittel, zum Beispiel durch 4stündiges Erhitzen mit 2%iger Schwefelsäure im siedenen Wasserbad verzuckert wird. Die Versuche, passende Katalysatoren aufzufinden, die die Xylanverzuckerung zu beschleunigen vermögen, waren erfolglos. Beispielsweise wird in Gegenwart von Natriumfluorid, das eine Fähigkeit besitzt, die Sauerstoffbrücken im Cellulosemolekül zu spalten (8), die einmal entstandene Xylose weiter zersetzt. Obwohl das Strohxylan durch Säure von höherer Konzentration noch leichter zerlegt wird, ist nach unseren Erfahrungen über 4%ige Schwefelsäure für den industriellen Gebrauch bei der Bereitung der Nahrungsmitteln nicht anwendbar. Denn ein Präparat, welches hergestellt wurde, indem das Strohpulver zuerst mit solcher Säure hydrolysiert, dann mit Calciumhydroxyd neutralisiert und weiterhin der Rückstand zusammen mit der Flüssigkeit getrocknet wird, wirkt auf das

Wachstum der Ratte besonders dann störend, wenn es in einer Proportion über 30 % mit dem Grundfutter gemischt wird.

Die Strohbestandteile werden auch durch Alkalien zersetzt. Durch alkalische Reagenzien wird aber reduzierender Zucker, der eins der wichtigsten Nahrungsbestandteile ist, gespaltet. In Tabelle XII sind die Resultate der Pentosanzersetzung durch Calciumhydroxyd im Vergleich mit denjenigen der Säurespaltung des Pentosans wiedergegeben.

Tabelle XII. Reaktionsmischung: 30 g Reisstroh + 150 ccm $Ca(OH)_2$-Lösung od. H_2SO_4.

Reagens	Konzentration des Reagens in %	Erhitzungs-temperatur in °C	Erhitzungs-dauer in Std.	Pentosan im Präparat in %	Pentose im Präparat in %
Ohne Reagens	—	—	—	24,1	2,57
$Ca(OH)_2$	1	100	5	14,7	0,56
$Ca(OH)_2$	2	100	5	11,6	0,52
H_2SO_4	2	100	4	5,5	15,20
H_2SO_4	4	100	2	4,8	12,90

Bei der Herstellung der Präparate, die in den obigen Versuchen benutzt wurden, wurde das Reisstroh nach der Hydrolyse durch Calciumhydroxyd oder Schwefelsäure mit Schwefelsäure oder Calciumhydroxyd neutralisiert. Wie aus diesen Daten zu erwarten ist, wird der Nahrungswert des Strohs durch die Kalkzersetzung nur ein wenig erhöht. Die Erhöhung des Nährwertes ist hierbei auf das Weichwerden der Strohfaser durch Alkali zurückzuführen.

Reagenzien, die bei der Herstellung der Strohpräparate verwerden, können dadurch erspart werden, dass man die mittels einer Säure zersetzten Präparate nicht mit Alkalien, sondern mit den mittels eines Alkalis zersetzten Präparaten neutralisiert. Da aber unter der Wirkung des Alkalis eine Zuckerspaltung stattfindet, wird angenommen, dass die in solcher Weise dargestellten Strohpräparate einen niedrigeren Nährwert haben, als die mit einer Säure allein zerlegten Präparate. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde ebenfalls durch die Fütterungsversuche an weissen Ratten bewiesen.

Auf dem Stroh leben gewöhnlich Mikroben, die imstande sind, Cellulosemoleküle abzubauen. Die Herstellung eines Komposthau-

fens aus Stroh beruht auf der Wirkung derartiger Mikroben. Wenn eine wässerige Suspension des Strohpulvers bei Zimmertemperatur stehen gelassen wird, so erfolgt in der Tat eine Abnahme des Cellulosegehaltes. Ist aber die Einwirkungsdauer der Mikroben kürzer als eine Woche, so ist der Zersetzungsgrad der Cellulose nur gering. Gleichzeitig wird auch eine Spaltung des Pentosans beobachtet; die Pentosanverminderung ist gleichfalls klein. Ausserdem erfahren die gebildeten Monosen durch die Mikrobenenzyme eine weitere Zerlegung und die Menge des reduzierenden Zuckers in den dargestellten Strohpräparaten wird noch geringer als im Ausgangsmaterial. Aus diesen Befunden ist anzunehmen, dass der Futterwert des Reisstrohs durch solche Veränderungen nicht so gesteigert wird. In Wirklichkeit zeigten die Tierexperimente, dass die Erhöhung der Ernährungsfähigkeit des Strohs durch die Wirkung derartiger Mikroorganismen gering ist.

Die Natur, das Molekulargewicht und folglich auch die Zersetzbarkeit der Cellulose, sind bis zu einem gewissen Grade von dem Ursprung abhängig. Die Versuche lehrten, dass die Cellulose des Reisstrohs gegenüber noch konzentrierterer Säuren ziemlich beständig ist. Die Glucosebildung aus der Cellulose ist gering, selbst wenn zum Beispiel das Strohlmehl 8 Tage bei 40° in einer 20 bis 30%igen Schwefelsäure liegt. Obwohl dabei eine ziemliche Menge reduzierender Zucker gebildet wird, besteht der grösste Teil derselben aus der Pentose. Die Pentosanzersetzung geht also unter solchen Versuchsbedingungen bedeutend stark vor sich. Wird das Reisstroh eine Stunde mit 20–30%iger Schwefelsäure auf etwa 90° erhitzt, so wird das Pentosan fast vollständig zerlegt, während sich die Monosenmenge wegen der zu kräftigen Säurewirkung vermindert. Wir haben dann unter der Anwendung der Schwefelsäure in gleicher Verdünnung einige Strohpräparate hergestellt. Das Reisstroh wurde 2 Tage bei 40° oder 1 Stunde bei 90° mit 30%iger Schwefelsäure zersetzt, filtriert und das Filtrat mit Calciumhydroxyd neutralisiert. Die Calciumsulfat abfiltrierte Lösung wurde mit dem Strohrückstand gemischt und getrocknet. Die erhaltenen Präparate wurden im Verhältnis von 20% mit einem Grundfutter gemengt und den Ratten gegeben. Dabei wurde gefunden, dass die Tiere bei der Versorgung mit solchen Futtermischungen schneller heranwachsen, als wenn sie Mischungen mit unbehandeltem Stroh fressen.

Aus den oben beschriebenen Tatsachen wird der Schluss gezogen, das Xylan im Reisstroh nach der Hydrolyse als Wärmequelle im Rattenkörper ausgenutzt werden kann. Wenn dies der Fall ist, so müssen Praparate, die Xylanabbauprodukte enthalten, einen höheren Ernährungswert haben, als Präparate, von denen derartige Abbauprodukte befreitet wurden. Das Strohpulver wurde 6 Stunden mit 1%iger Schwefelsäure auf 85° erwärmt, ein Teil davon mit Calciumhydroxyd neutralisiert und ein anderer ohne Neutralsierung filtriert. Bei der Herstellung des ersteren Praparats wurde der Strohrückstand zusammen mit der Lösung und bei der des zweiten der Rückstand allein getrocknet. Die Zusammensetzungen der beiden Strohpräparate sind in Tabelle XIII widergegeben.

Tabelle XIII. Zahlen: % des einzelnen Bestandteils in der Trockensubstanz des Praparats.

	Roh-protein	Stickstoffreie Extraktstoffe	Rohfett	Rohfaser	Asche	Pentosan	Reduzierender Zucker
Neutralisiertes Präparat	3,97	25,46	0,67	18,57	31,12	16,26	4,13
Filtriertes Präparat	4,39	37,35	0,73	24,90	16,03	16,04	0,56

Beim filtrierten Praparat ist, wie erwartet, die aus Strohxylan gebildete Xylose beseitigt worden. Die Ernährungsexperimente wurden mit einer Futtermischung von 80% Grundfutter und 20% Strohpräparaten ausgeführt (Tabelle XIV).

Tabelle XIV. Futterbestandteil: Angegeben getrennt; neutralisiertes Präparat, filtriertes Praparat; Rohprotein 21,52%, 21,64%; Stickstoffreie-Extraktstoffe 55,44%, 57,82%; Rohfett 2,78%, 2,79%; Rohfaser 6,25%, 7,52%; Asche 9,97%, 6,95%.

	Anfangskörpergewicht der Ratte in g	Endkörpergewicht der ratte in g	Körpergewichtszunahme der Ratte in g	Aufgenommene Futtermenge wahrend der Versuchdauer in g
Neutralisationsgruppe........	74	160	86	752
Filtrationsgruppe	74	154	80	744

Die angeführtdn Resultate betreffen nur die Männchen. Die Körpergewichtszunahme wird desto langsamer, je mehr die Ratte sich der Pubertät nähert und die Ergebnisse wurden allmählich undeutlicher. Um den Einfluss der Stropräparate auf das Rattenwachstum deutlich zu zeigen, wurden in dieser Versuchsreihe nur die Daten in der Zeit angegeben, in der die Tiere noch im kräftigen Wachstum stehen. Die Mengen der Nahrungsstoffe sowie der Energie, die für die Körpergewichtszunahme von 100 g notwendig sind, lehren Tabelle XV.

Tabelle XV. Versuchtier: Ratten mannchen.

	Nahrung in g	Rohprotein in g	Stickstoffreie Extraktstoffe in g	Rohfett in g	Energie in kcal	Energie Verhältnis
Neutralisationsgruppe	874	188	484	23	2875	100
Filtrationsgruppe	930	200	633	25	3557	122

Das Reisstroh wurde ferner mit Calciumhydroxyd in ähnlicher Weise zersetzt und zwei ähnliche Präparate hergestellt. Da aber unter der Einwirkung des Alkalis keine Anhäufung der Monosen erfolgt, ist hierbei der Erhöhungsgrad des Nährwertes durch die Neutralisation kleiner, als bei der Säurezersetzung.

Durch die oben erwähnten Versuche konnte der Ernährungswert des natürlichen, in Pflanzen befindlichen Xylans für verschiedene Tiere nachgeweiesen werden. Die Ernährungsversuche mit dem rein isolierten Xylan sind im Gange.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Unterrichtsministeriums unterstützt.

(Aus dem Agrikulturchemischen Institut der Kyushu-Universitat in Fukuoka, Japan).

Literatur

1) *Yamafuji* u. *Urakami*, J. Fac. Agr., Kyushu Univ. **9**, 333, (1950).——2) *Cleveland*, Am. Jl. Hyg. **3**, 444 (1923); Quart. Rev. Biol. **1**, 51 (1923).——3) *Trager*, Biochem. Jl. **26**, 1762 (1932).——4) *Cremer*, Zs. Biol. **29**, 484 (1892).——5) *Thomas*, *Gradinescu* u. *Imas*, Chem. Zentralbl. 1929, **1**, 2897.——6) *Frenzel*, Pflüger's Arch. **56**, 273 (1894).——7) *Iwata*, Jl. agricult. chem. Soc. Japan **6**, 804 (1930); **8**, 1175, 1252 (1932).——8) *Fredenhagen* u. *Helferich*, Zs. angew. Chem. **46**, 113 (1933).

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

STUDIES ON FOODSTUFFS IN EMERGENCIES. XXII. ON THE STARCH OF *LYCORIS RADIATA*

Kazuo Yamafuji and Tetsuzo Tono

Lycoris radiata has been generally called "Higanbana" in Japan and its bulb contains a considerable amount of starch. This plant is widely distributed in various fields and forests, but it is unsuitable for eating. There exist several poisonous alkaloids in the bulb of *Lycoris* and the chemical constitution of lycorine, the principal base, was clarified by Kondo et al (1). Since these alkaloids have been utilized as medicine, we already studied the extraction, adsorption (2) and elusion (3) of the bases. On the other hand Kihara (4) investigated the nature of polysaccharides in *Lycoris* root, and in this institute we also performed some experiments concerning the alcoholic fermentation (5) of these polyoses. In the present article we shall report the results of investigations on the isolation of starch and its decomposition by amylase.

Experimental

1. Isolation of starch: The tubers of Higanbana were gathered, dried at room temperature and ground in a mortar. The analysis of this powder gave the data shown in Table 1.

Table 1. Chemical composition of root powder.

Starch, %	Reducing sugar, %	Total N, %	Fibre, %	Ash, %	Water, %
18.65	1.63	0.61	2.82	3.26	18.07

An example of isolation experiments was carried out as follows: 5 g bulb powder was mixed with 50 g water and after 20 hrs. supernatant liquid decanted. The residue was thoroughly

ground in a glass mortar, filtered through a gauze and mixed with water again. This procedure was repeated 3 times and starch particles deposited were gathered. The yield of starch averaged 60%.

It is assumed that the extraction of starch from tuber is influenced by the hydrogen ion concentration of solution. The tuber powder was immersed into diluted hydrochloric acid and in similar manner starch prepared. The results obtained are given in Table 2.

Table 2. Relatien between yield of starch and acidity of solution.

Conc. of HCl, %	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Yield of starch, %	45	60	77	88	81	75	65	60

By hydrochloric acid of 0.2—0.5% some constituents other than starch are extracted from the plant material. Therefore, the preparations made by using such acid solutions were impure.

In order to compare the extracting power of alkalis with that of acids 100 cc of solution was added to 1 g of bulb powder, after 20 hrs. at 36°C the mixture filtered and the sugar content in this filtrate determined after the hydrolysis.

Table 3. Extraction of starch by alkali.

Conc. of reagent, %	0.2% NaOH	0.2% Na_2CO_3	H_2O	0.2% H_2SO_4	0.2% HCl
Yield of starch, %	22.5	22.3	20.7	21.3	22.6

It can be seen from the data in Table 3 that the amount of starch which was extracted by diluted alkalis is much the same as that obtained by treating with acids. Moreover, the alkaline solution of *Lycoris* root is glutinous and we are unable to isolate from this a starch precipitate.

It appears to us that the yield of starch varies with the time of extraction. 5 g of root powder were immersed into 30 cc of water and after 3 hrs. the mixture was filtered. The residue was ground with water and then it was left stand at 24°C for 1 to 8 days. From these solutions starch particles were gathered by the filtration with a cotton cloth.

Table 4. Relation between time of extraction and yield of starch.

Time of extraction, day	1	2	3	4	5	6	7	8
Yield of starch, %......	40.9	48.3	53.8	56.9	57.2	51.6	47.5	45.5

It will be seen from Table 4 that too short or too long extraction gives rather a low yield of tuber starch. Therefore, the time of immersion must be regulated according to the temperature.

The powder of *Lycoris* bulbs swells in water and this phenomenon seems to have a close connection with the extraction of starch. Accordingly, we selected the particles of the same size out of a large quantity of bulb powder, put them in a graduated tube which has been held in water and after varying time intervals determined the volume of swollen particles. The experiments of this kind resulted that after 1 hr. at 27°C the root powders swelled to 180% and after about 2 hrs. the degree of swelling reached to its maximum, namely 190%.

The figures in Table 5 showed that the increase of particle volume after the immersion in water is affected by the variation of temperature.

Table 5. Variation of swelling by temperature.

Temp. of immersion, °C	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Degree of swelling, %	164	178	188	208	226	246	258	268	250	200

The degree of swelling is highest at 50°C and over 60°C the peptization takes place. In the experiments mentioned above the time of immersion was 40 min. We further estimated the volume of tuber particles in acid or alkali solutions.

Table 6. Swelling of tuber powder in various solutions.

Temperature of immersion, °C	20	30	40	50	60
Swelling in 1% HCl	210	230	270	215	—
Swelling in 5% NaOH	225	270	300	280	250
Swelling in 1% Na_2NO_3	225	245	250	280	240

As is shown in Table 6, the greatest increase of tuber volume is brought about in sodium hydroxide solution.

In general, it is somewhat difficult to prepare *Lycoris* starch of superior quality in good yield. For example, the glucose determination after acid hydrolysis gave the results represented in Table 7.

Table 7. Purity of *Lycoris* starch preparation.

	Excellent quality	Bad quality
Starch content, %	90.0	73.4

The preparations of inferior quality were made from the residue which remained after the isolation of those of good quality.

2. Action of amylase: There is no report on the enzymatic decomposition of *Lycoris* starch. In the present investigation we used two kinds of enzymes of different origins, viz. malt amylase and Taka diastase. Barley malts were manufactured in this laboratory and dried at 40°C. The extract of malt powder or the suspension of Taka diastase was employed as amylase preparation. For instance, 1 cc of such a enzyme solution was added to the mixture of 25 cc 1% starch solution and 10 cc phosphate buffer. In most experiments the time of reaction was 40 min. and the temperature 55°C.

Table 8. Action of amylase on *Lycoris* starch at various acidities.

pH of solution	4.5	4.8	5.4	5.6	5.9	6.3	6.9	7.2	7.7
Malt; mg glucose	118	122	132	140	136	127	116	89	46
Taka; mg glucose.	124	132	135	130	123	121	106	102	82

The data of Table 8 indicate that in alkaline medium the activity of amylase is relatively weak.

In the experiments in Table 9 the acidity of solutions was kept at pH 5.4. The results obtained show that the enzymatic hydrolysis of *Lycoris* starch occurs powerfully even at high temperature.

Table 9. Amylolytic decomposition of starch at different temperatures.

Temp. of reaction	36	45	50	55	60	65	70	75
Malt; mg glucose ...	48	62	66	72	78	79	46	41
Taka; mg glucose ...	52	61	67	65	59	54	36	21

From the data in Table 10 it appears that neutral salts have no influence upon the saccharification of *Lycoris* starch by malt and Taka amylase.

Table 10. Effect of salts upon enzymatic hydrolysis of starch.

Kind of salt	NaCl	NH_4Cl	$(NH_4)_2 SO_4$	KNO_3	H_2O
Malt ; mg glucose	67	66	65	62	60
Taka ; mg glucose	63	61	58	55	57

The determination of viscosity was carried out with an Ostwald's apparatus. The *Lycoris* starch is easily liquefied by malt amylase, as the figures in Table 11 indicate.

Table 11. Liquefaction of *Lycoris* starch at different hydrogen ion concentrations.

Acidity of solution, pH	5.0	5.4	5.6	5.9	6.2	6.4	6.6
Time of flow, sec.	182	179	177	174	176	178	180

Table 12. Enzymatic liquefaction of starch at varius temperatures.

Temp. of reaction, °C.	37	42	47	52	59	65	70
Time of flow, sec.	185	174	180	181	184	187	190

As can be seen from Table 12, the optimum temperature for the liquefaction is 42°C. In these experiments the time of reaction was always 20 min.

Summary

Experiments on the preparation of *Lycoris* starch were carried out under various conditions. It seems somewhat difficult that the starch of excellent quality is isolated from the bulbs in high yield.

Various experiments on the decomposition of *Lycoris* starch by amylase were also performed. It was found that the starch is easily decomposed by malt amylase as well as by Taka diastase.

We wish to express our thanks to Mr. T. Miyakuni and Mr. M. Watayama for their assistance.

References

1) H. Kondo et al.: Jl. pharm. Soc. Japan, **52**, 433 (1932) **54**, 997 (1934).

2) K. Yamafuji and H. Kondo: Jl. Agr. Chem. Soc. Japan, in press.

3) T. Akita and T. Nakashima: ibid., in press.

4) Y. Kihara: ibid., **9**, 1005 (1933).

5) K. Yamafuji and T. Akita: ibid., in press.

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 4
November 30, 1950

STUDIES ON THE CYTOCHROME OXIDASE. IV. EFFECT OF SALTS ON THE CYTOCHROME OXIDASE

MEGUMU INAOKA

INTRODUCTION

Although it was shown that cytochrome oxidase is widely distributed with cytochromes in cells of aerobic organisms and one of the most important oxidizing enzymes for intracellular respiration[1], we have no accurate knowledge about the nature of this enzyme, because its pure enzyme preparation has not yet been obtained.

In a previous paper[2], I examined the preparing method of the crude enzyme preparation and some conditions for the measuring of its activity. And it was found that this oxidase is extracted not by acidic buffer solution but by neutral or basic side of pH, and the optimum pH for the oxidase activity of this preparation in phosphate buffer solution is at pH 7.17.

In this paper, I propose to examine the effect of several salts on the cytochrome oxidase activity. I have not yet found a report descriptive of this problem in literature. I found that the presence of a neutral salt activated the oxygen consumption when hydroquinone is oxidized by this cytochrome oxidase preparation.

EXPERIMENTAL

1) *Preparation of enzyme and measuring method of its activity*

Throughout this study, I have made use of the following procedure. Heart muscle of ox cleaned from fat and ligaments is minced and pressed out blood as much as possible, and then washed five or six times in water with stirring it at the same

time. 50 g. of this pulp is mixed with 15 c.c. M/15 phosphate buffer solution of pH 6.81 and a little sand, and ground in a mortar. The thick paste thus obtained is mixed with 35 c.c. of the same buffer and centrifuged hard. Red-brown cloudy fluid is obtained. This fluid consists of a very finely divided suspension of muscle tissue and contains not only cytochrome oxidase but cytochrome c. Therefore, at the measurement of oxidase activity of this enzyme preparation, the addition of cytochrome c is unnecessary.

The oxidase activity of this preparation is determined by measuring the amount of oxygen used up when hydroquinone is oxidized in Warburg apparatus.

2) *Effect of* NaCl

As the used enzyme preparation is not pure, its activity is not constant according to the condition of extraction. Therefore, at the experiment the control test is carried out at the same time. The effect of NaCl on this enzyme system is shown in Table 1.

Table 1. Effect of NaCl on the cytochrome oxidase. (Enzyme preparation 1 cc., 0.27 M hydroquinone 0.2 c.c. and NaCl solution 1 c.c., at 37°C.)

Concentration of NaCl	0	M/2.4	0	M/7.3	M/11	0	M/22	M/44
O_2 uptake in 20 min. (c. mm.)	147.0	67.6	158.0	180.8	199.0	164.6	218.0	205.6
Relative activity	100.0	46.0	100.0	114.3	126.0	100.0	132.4	124.6

Concentration of NaCl	0	M/66	M/88	0	M/94	M/480
O_2 uptake in 20 min. (c. mm.)	206.0	235.5	233.0	218.0	231.0	220.0
Relative activity	100.0	114.0	112.6	100.0	106.0	101.0

From the results shown in Table 1, it is found that NaCl accelerates the oxidation of this enzyme system, and when the concentration of NaCl is M/22, the activity is maximum.

3) *Effect of* KCl

The properties of KCl resemble that of NaCl chemically. Therefore, I examined the effect of KCl next time, and found its effect also resembles that of NaCl as shown in Table 2.

Table 2. Effect of KCl on the cytochrome oxidase. (Enzyme preparation 1 c.c., 0.27 M. hydroquinone 0.2 c.c. and KCl solution 1 c.c., at 37°C.)

Concentration of KCl	0	M/22	M/44
O_2 uptake in 20 min. (c. mm.)	154.9	212.0	195.6
Relative activity	100.0	136.9	126.0

These data of Table 1 and Table 2 are results of experiments with the fresh enzyme preparation. The activation effect of these salts is the strongest when the oxidase preparation is fresh. If the oxidase preparation is stored in an ice chest, the activation ratio decreases with a decrease of oxidase activity. That is found from the result shown in Table 3 in contrast with Table 1.

Table 3. Effect of NaCl and KCl on the 5 days stored enzyme preparation. (Enzyme preparation 1 c.c., 0.27 M. hydroquinone 0.2 c.c. and salt solution 1 c.c., at 37°C.)

	NaCl			KCl		
Concentration of salt	0	M/22	M/44	0	M/22	M/44
O_2 uptake in 20 min. (c. mm.)	160.0	186.0	168.3	159.2	187.0	178.8
Relative activity	100.0	116.2	105.1	100.0	117.0	112.0

The activity given in Table 3 shows that of the same oxidase preparation with that in Table 1, after 5 days storage in an ice chest.

4) *Effect of* $MgCl_2$

Next time, the experiment on the effect of $MgCl_2$ which has the same anion with NaCl and KCl was carried out. The results are given in Table 4.

Table 4. Effect of $MgCl_2$ on the cytochrome oxidase. (Enzyme preparation 1 c.c., 0.27 M. hydroquinone 0.2 c.c. and salt solution 1 c.c., at 37°C.)

Concentration of $MgCl_2$	0	M/22	M/44	M/440	0	M/240	M/800
O_2 uptake in 20 min. (c. mm.)	167.2	28.5	71.2	189.5	200.0	209.0	210.0
Relative activity	100.0	17.0	42.6	113.0	100.0	104.5	105.0

The activation effect of $MgCl_2$ is different from that of NaCl or KCl, and has a maximum point at the concentration of about M/440 as shown in this table. At the concentration of M/22, at which NaCl or KCl has the strongest activation effect, $MgCl_2$ inhibits considerably the oxidase activity.

From these results, it is found that the activation effect of salts on the cytochrome oxidase depends upon not its anion but its cation.

Summary

1. The effect of NaCl, KCl and $MgCl_2$ on the crude cytochrome oxidase preparation was examined.

2. The presence of these salts activated the activity of the cytochrome oxidase system.

3. The activation effect is maximum at the concentration of M/22 for NaCl and KCl, while it is at the concentration of M/440 for $MgCl_2$.

4. This activation effect of salt depends upon not its anion but its cation.

The author is indebted to the scientific research fund of the Department of Education for a part of expenditure of this research.

References

1) Keilin, D., Roy. Soc. Proc. London, B, 106, 418 (1930).

2) Inaoka, M., Bull. Agr. Chem. Soc. Jap., 23, 376 (1950).

JOURNAL OF
THE FACULTY OF AGRICULTURE
KYUSHU UNIVERSITY

Volume 9

1948—1950

PUBLISHED BY THE FACULTY
FUKUOKA

CONTENTS

No. 1, March 31, 1948

Fukushima, Eiji—Cyto-genetic studies on the Pomoideae. I. Chromosome number of the cultivated varieties of apples, European pears, and Japanese pears cultivated in Japan .. 1
Aikawa, Hiroaki and Hanamura, Nobuhiko—On age and race of some salmonid fishes 21
Irie, Haruhiko—Preliminary report on pelagic Amphipods in the adjacent Seas of Japan 33
Aikawa, Hiroaki—The magnitude of population and fishing rate of King-crab, *Paralithodes camtschatica* (Tilesius) ... 41
Aikawa, Hiroaki and Irie, Haruhiko—The magnitude and fishing rate of the population of snapper, *Pagrosomus major* (Temminck and Schlegel) 51
Segawa, Sokichi—A new Laminariaceous alga found in Izu ... 59
Tsuchiya, Yasuhiko—Studies on the method for the preparation of strontium from corals and calcareous algae 65
Tomiyama, Tetuo—Biochemical studies on nutrition under special environment. I. An apparatus capable of keeping the reduced pressure constant 69
Tomiyama, Tetuo, Yabuki, Teruo and Nakano, Sizue—Biochemical studies on nutrition under special environment. II. The effect of reduced pressure upon digestibility ... 75
Hirai, Keizo—The boron content of soils, plants, and fertilizer materials 83
Funatsu, Masaru—Die Farbenreaktionen von Aminosäuren mit Diphenylamin. I. Eine neue Farbenreaktion von Eiweiss mit Diphenylamin 93

No. 2, May 31, 1949

Yasumatsu, Keizô and Tachikawa, Tetsusaburo—Investigations on the Hymenopterous parasites of *Ceroplastes rubens* Maskell in Japan 99
Yasumatsu, Keizô—Rearing of flea larvae on various diets ... 121
Tange, Masaharu—Further data on the crossing of albino ring doves with white ones 127

Segawa, Sokichi—The gonimoblast development in Ceramiaceous algae of Japan. I. 143
Maekawa, Kazuyuki—Über die Einwirkung von Hypohalogenit auf Methylfurfural. 149
Maekawa, Kazuyuki—Ein dimeres Methylfurfural 159
Sasaki, Shuiku and Miyauchi, Masato—The amino acids of the sericin fractions of silk. 167
Shirakawa, Masaharu—Studien über die kristallisierte Katalase (IV). Molekulargestalt und Molekulargewicht 173
Funatsu, Masaru—Studies on the protein of soy bean. The effects of neutral salts of low concentration on the stability of soy bean protein dispersed in water 185
Kumagai, Saizo A modification of Ekdahl's method for routing floods through reservoirs 203

No. 3, January 31, 1950

Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo—A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". I. Symptom and pathogenic nematode 209
Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo—A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". II. Hibernation of *Aphelenchoides oryzae* 223
Segawa, Sokichi—The gonimoblast development in Ceramiaceous algae of Japan. II. 235
Aikawa, Hiroaki, Hayashi, Tomoo and Hanamura, Nobuhiko—On the mass reactions of gold fish and carp against the toxic substance 241
Aikawa, Hiroaki, Hayashi, Tomoo and Furuno, Yasuo—Vertebral count and growth of Japanese Anchovy, *Engraulis japonicus* Temminck and Schlegel 255
Katayama, Teruhisa and Tomiyama, Tetuo—A study on a new acidic compound isolated from volatile portion of a green alga, *Ulva pertuosa* 271
Katayama, Teruhisa and Tomiyama, Tetuo—The change in ascorbic acid content of *Porphyra tenera* due to ecological and processing conditions 275
Sasaki, Shuiku and Watanabe, Tadao—An improved method for the preparation of glycine 283

No. 4, November 30, 1950

Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo—A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". III. Infection course of the present disease 287
Yoshii, Hajime and Yamamoto, Shigeo—A rice nematode disease, "Senchû Shingare Byô". IV. Prevention of the present disease 293
Hamada, Matsukichiro und Maekawa, Kazuyuki—Über die Oxydation von Xylan mit Perjodat 311
Yamafuji, Kazuo and Yuki, Teigen—Ueber den Mechanismus der Virusentstehung in der Zelle 318
Yamafuji, Kazuo und Goya, Tsutomu—Verhütung der Viruserkrankung durch Eisenverbindungen 325
Yamafuji, Kazuo und Urakami, Munehiko—Ueber die Einwirkung von Eisen und Hydroperoxyd auf Polysaccharide 333
Yamafuji, Kazuo und Shibatate, Shigero—Ueber den Ernährungswert von Xylan 341
Yamafuji, Kazuo and Tono, Tetsuzo—Studies on foodstuffs in emergencies. XXII. On the starch of *Lycoris radiata* ... 355
Inaoka, Megumu—Studies on the cytochrome oxidase. IV. Effect of salts on cytochrome oxidase 361

九州大學農學部紀要
第9卷, 第4冊

昭和二十五年十一月二十五日印刷
昭和二十五年十一月三十日發行

編纂兼發行者　九州大學農學部

九州大學內
印刷者　堀川庄三

印刷所　九州大學印刷所